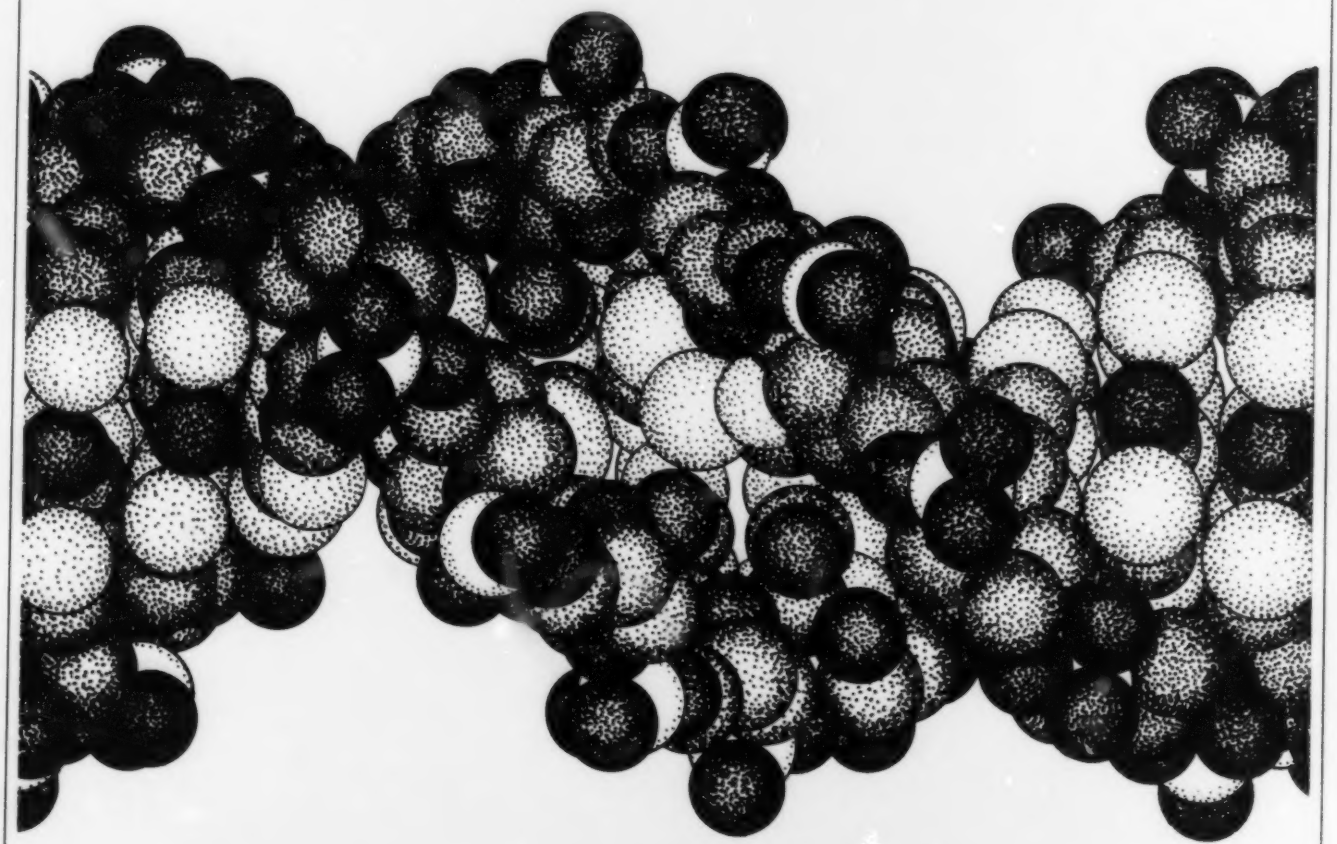
Les fondements du génie phytogénétique et applications possibles aux essences forestières

P.J. Charest et M.-F. Michel
Institut forestier national de Petawawa • Rapport d'information PI-X-104F



Forêts Canada Forestry Canada

Canada

INSTITUT FORESTIER NATIONAL DE PETAWAWA

Le mandat de l'Institut forestier national de Petawawa, comme celui des autres établissements de Forêts Canada, est de promouvoir une meilleure gestion et une utilisation plus rationnelle des ressources forestières du Canada, pour le bien économique et social de tous les Canadiens. Les objectifs des activités des programmes menés à l'Institut appuient ce mandat à travers la découverte, le développement, la démonstration, l'application et le transfert des innovations. En tant qu'institut national, il doit s'attacher à des problèmes qui débordent le cadre régional ou qui nécessitent des compétences particulières de même qu'un équipement non disponible aux installations régionales de Forêts Canada. La plupart du temps, les recherches sont effectuées en étroite collaboration avec le personnel des centres régionaux, des services forestiers des provinces et de l'industrie forestière.

Les travaux de recherche et les services techniques de l'Institut sont regroupés autour de cinq principales activités:

GÉNÉTIQUE FORESTIÈRE ET BIOTECHNOLOGIE — Ce programme encadre des études sur la génétique forestière, la microbiologie, la micropropagation, la génétique moléculaire et la recherche sur les semences. Il comprend également les services à la clientèle et la banque de semences du Centre national de semences forestières. Lié à plusieurs organismes internationaux, ce centre existe depuis longtemps.

SYSTÈMES D'AMÉNAGEMENT FORESTIER — Ce programme intègre en recherche et développement des opérations concernant les incendies de forêt, la télédétection, la météorologie, la modélisation, la croissance, la récolte et le RIMA. Il permet ainsi l'élaboration et la démonstration de systèmes d'aménagement forestier.

STATISTIQUES NATIONALES SUR LES RESSOURCES FORESTIÈRES — Ce programme fournit les renseignements biologiques, techniques et socio-économiques sur les ressources forestières du Canada. Il vise le développement des bases de données et l'établissement de nouveaux logiciels et bases de données pour aider à l'élaboration des politiques forestières. Le Programme d'inventaire forestier recueille l'information sur les forêts au niveau national, maintient le Système sur les ressources forestières canadiennes et prépare l'inventaire des forêts du Canada.

COMMUNICATIONS — Ce programme regroupe les services offerts par la bibliothèque, les travaux touchant la sensibilisation du public, les renseignements, la rédaction-révision et les publications. L'Institut reçoit plus de 20 000 visiteurs chaque année. Le Centre d'accueil, des visites autoguidées et un programme éducatif complet sont ouverts à tous. C'est à l'IFNP que l'on trouve l'entrepôt et le centre de distribution national de toutes les publications scientifiques de Forêts Canada.

LA FORÊT EXPÉRIMENTALE — Outre des peuplements naturels où l'on applique divers traitements dans le cadre des plans de recherche en sylviculture, la Forêt de Petawawa, mesurant 100 km^2, comprend de vastes superficies de plantations âgées de plus de 60 ans. Les plantations expérimentales livrent des données sur la croissance et la récolte à la suite des expériences de culture. Elles fournissent aussi du matériel génétique dont le lignage est répertorié et qui se révèlent de plus en plus utiles pour les études sur la micropropagation et la génétique moléculaire. C'est un lieu par excellence pour mettre à l'essai des stratégies d'aménagement forestier à court et à long termes.

Page couverture : illustration d'une partie d'une molécule ADN

93-00214/

LES FONDEMENTS DU GÉNIE PHYTOGÉNÉTIQUE ET APPLICATIONS POSSIBLES AUX ESSENCES FORESTIÈRES

P.J. Charest et M.-F. Michel

Rapport d'information PI-X-104F
Institut forestier national de Petawawa
Forêts Canada
1992

©Ministre des Approvisionnements et Services Canada, 1992
N° de catalogue Fo46-11/104-1991F
ISBN 0-662-97697-5
ISSN 0228-0736
Imprimé au Canada

Il est possible d'obtenir sans frais des exemplaires de cette publication en communiquant avec :

Forêts Canada
Centre national de diffusion des publications
Institut forestier national de Petawawa
Chalk River (Ontario)
K0J 1J0

Téléphone : 613-589-2880

Des copies ou des microfiches de cette publication sont en vente à l'adresse suivante :

Micromédia Ltée
Place du Portage
165, rue Hôtel-de-Ville
Hull (Québec)
J8X 3X2

This publication is also available in English under the title
Basics of plant genetic engineering and its potential applications to tree species.

DONNÉES DE CATALOGAGE AVANT PUBLICATION (CANADA)

Charest, Pierre J., 1958-

Les fondements du génie phytogénétique et applications possibles aux essences forestières

(Rapport d'information ; PI-X-104F)
Comprend un résumé en anglais.
Comprend des références bibliographiques.
ISBN 0-662-97697-5
N° de cat. MAS Fo46-11/104-1991F

1. Génie génétique végétale. 2. Génétique végétal. 3. Plantes transgéniques. 4. Génétique forestière -- Canada. I. Michel, M.-F. (Marie-France). II. Institut forestier national de Petawawa. III. Titre. IV. Coll.: Rapport d'information (Institut forestier national de Petawawa) ; PI-X-104F.

SB123.57C42 1992 631.523 C92-099742-2

Table des Matières

v Résumé/Abstract

1 1. Introduction

1 2. Principales notions et des définitions

1 2.1 Définitions
2 2.2 Grandes étapes de la phytobiologie moléculaire et du génie phytogénétique

3 3. Méthodes de transformation génétique

3 3.1 Introduction
3 3.2 Méthodes de transformation directe des gènes
3 3.2.1 Introduction au moyen du polyéthylène glycol ou de l'alcool polyvinylique
4 3.2.2 Électroporation
4 3.2.3 Introduction par l'intermédiaire de liposomes
4 3.2.4 Introduction par transmission avec des sphéroplastes
5 3.2.5 Micro-injection
5 3.2.6 Micro-projection
6 3.2.7 Macroinjection
6 3.2.8 Introduction par microfaisceau-laser
6 3.2.9 Introduction par l'intermédiaire du tube pollinique
6 3.2.10 Introduction par imbibition des semences
6 3.2.11 Introduction par l'intermédiaire de fibres de carbure de silicium
6 3.3 Transfert indirect de gènes
6 3.3.1 Transformation génétique naturelle par *Agrobacterium*
7 3.3.1.a Rôle de l'ADNt
8 3.3.1.b Fonction de la région VIR
10 3.3.1.c Fonctions des gènes chromosomiques d'*Agrobacterium*
11 3.3.2 Génie phytogénétique avec des plasmides Ti ou Ri d'*Agrobacterium*
13 3.4 Récupération des plantes transgéniques
13 3.4.1 Espèces végétales génétiquement transformées
15 3.4.2 Marqueurs de transformation génétique et construction de gènes
17 3.5 Confirmation d'une transformation génétique stable
18 3.6 Effets physiologiques de l'introduction de gènes étrangers

18 4. Génie phytogénétique avec des gènes d'utilité agronomique

18 4.1 Résistance à des viroses
20 4.2 Résistance aux insectes
21 4.3 Résistance aux métaux lourds
21 4.4 Résistance aux herbicides
23 4.5 Résistance à des mycoses
24 4.6 Résistance à des bactérioses
24 4.7 Régulateurs de croissance
24 4.8 Qualité des fruits et des légumes
25 4.9 Modification de la couleur des fleurs
25 4.10 Production de composés chimiques à action biologique
25 4.11 Stérilité florale

26 5. Application du génie génétique aux espèces forestières

26 5.1 Transformation génétique chez les arbres
26 5.2 Problèmes particuliers associés au génie génétique chez les espèces forestières
30 5.3 Caractères potentiels à transmettre aux espèces forestières

31 6. Répercussions écologiques possibles des espèces forestières génétiquement modifiées

32 7. Réglementation relative à l'essai et à la mise en circulation des arbres transgéniques, au Canada

34 8. Recherche au Canada

34 Remerciements

34 Bibliographie

Liste des Tableaux

2 1. Étapes importantes en génie phytogénétique
7 2. Classification des plasmides Ti et Ri d'*Agrobacterium*
10 3. Sommaire des fonctions possibles des gènes chromosomiques et de la virulence qui participent à la transformation par *Agrobacterium*
11 4. Plasmides Ti modifiés et désarmés, ainsi que leur origine
14 5. Espèces végétales qui ont produit des plantes transgéniques
15 6. Nombre total d'espèces qui ont produit des plants et des callus transformés
16 7. Gènes marqueurs utilisés en génie phytogénétique
17 8. Caractéristiques d'un marqueur sélectionnable idéal en vue de la transformation d'organismes végétaux, à comparer aux caractéristiques du gène de la néomycine phosphotransférase II (NPT II)
19 9. Protection virale chez des plantes transgéniques
21 10. Inhibiteurs protéiques des protéinases
22 11. Génie génétique conférant la résistence aux herbicides à des plantes
27 12. Transformation génétique d'espèces forestières appartenant aux angiospermes
28 13. Transformation génétique d'espèces appartenant aux gymnospermes
29 14. Séquences d'ADN caractérisées chez des conifères
32 15. Stades de développement et mécanismes possibles de contrôle de matériel végétal génétiquement modifié
33 16. Renseignements requis en vue d'une demande d'importation et d'essai sur le terrain de matériel végétal génétiquement transformé
34 17. Groupes actifs participant au génie génétique appliqué aux arbres au Canada
34 18. Estimation des essais de plantes transgéniques sur le terrain au Canada et aux États-Unis

Liste des Figures

4 1. Électroporation de protoplastes végétaux.
5 2. Micro-projection d'ADN dans des cellules ou des tissus végétaux.
8 3. Structure de différents ADNt de plasmides Ti et Ri.
11 4. Schéma des réactions moléculaires qui participent au transfert de l'ADNt.
12 5. Dérivation du plasmide Ti désarmé pAL4404 et de son ADNt pAL1050.
12 6. Dérivation des plasmides Ti désarmés pGV3850 et pMP90.
13 7. Conjugaison triparentale entre *E. coli* et *A. tumefaciens*.
18 8. Schéma d'un gène d'origine végétale.

RÉSUMÉ

Le génie phytogénétique a progressé à pas de géant depuis la première régénération d'une plante transgénique, il y a 8 ans. Le présent rapport d'information passe en revue les procédés les plus modernes de génie phytogénétique, que ce soient les méthodes directes ou les méthodes indirectes de transfert des gènes. Une liste détaillée énumère toutes les espèces végétales chez lesquelles des plantes transgéniques ont été obtenues. Les critères d'intégration stable y figurent également. En outre, on examine des caractères agronomiques utilisés en génie génétique. L'analyse comprend l'application aux espèces forestières de technologies génétiques qui étaient élaborées antérieurement en fonction des plantes vivrières. Pour commencer, les résultats obtenus par transformation génétique sont étudiés; ensuite, on se penche sur les problèmes reliés aux espèces forestières. L'emploi de caractères agronomiques en vue de l'application du génie génétique aux espèces forestières est aussi décrit. La dernière section traite des incidences écologiques que peuvent avoir des arbres assujettis au génie génétique ainsi que des règlements relatifs aux épreuves et à la commercialisation d'arbres transgéniques. Le rapport se ferme sur un aperçu de la recherche dans le domaine de la transformation génétique des arbres au Canada.

ABSTRACT

The genetic engineering of plants has advanced phenomenally in the eight years since the first regeneration of a transgenic plant. The present information report reviews the state-of-the-art in the techniques of genetic engineering for plants, covering both direct and indirect gene transfer methods. A comprehensive list of all plant species in which transgenic plants have been recovered has been compiled and criteria for proof of stable integration are given. As well, agronomic characters used for genetic engineering are reviewed. The application of technologies developed with crop plants to tree species is discussed, starting with a survey of genetic transformation results followed by a discussion on problems associated with tree species. The use of agronomic characters for genetic engineering of trees is covered, and the report concludes with sections on the ecological impacts of genetically engineered trees, regulations for testing and release of transgenic trees, and a brief overview of

À la mémoire de la regrettée Marie-France Michel

1. INTRODUCTION

Les plantes peuvent être régénérées en culture à partir des cellules individuelles isolées, et former des organismes complets identiques au parent. Ce caractère unique rend ces derniers très intéressants pour la recherche en biologie moléculaire. Les cellules végétales peuvent être transformées génétiquement au moyen d'ADN exogène; les plantes transgéniques régénérées, qui portent l'ADN maintenant intégré dans leur génome, peuvent servir à l'étude de l'expression des gènes et de la régulation par les gènes.

La production de plantes transgéniques est assez récente (voir en 3.4.1); la plupart ont été obtenues des systèmes végétaux modèles tels que *Nicotiana tabacum* (tabac) et *Petunia hybrida* (Saint-Joseph ou petunia), tous deux de la famille des Solanacées. Il est beaucoup plus difficile de produire des plantes transgéniques à partir des espèces vivrières et des espèces forestières à cause d'insuffisances dans les systèmes culturaux (voir en 3.4.1.). La technique la plus avancée de transformation génétique des plantes exploite la bactérie phytopathogène *Agrobacterium tumefaciens* (voir en 3.3.1) (à l'origine de la tumeur du collet). L'origine moléculaire de cette maladie est le transfert de l'ADN plasmidique (ADNt, soit l'ADN de transfert) dans le génome de la cellule végétale, et son expression subséquente, qui conduit à une prolifération anormale de la cellule transformée (voir en 3.3.1). L'application aux plantes de cette technique est limitée par le spectre d'activité de la bactérie; cependant, d'autres méthodes de transformation ont été mises au point; ces dernières sont complémentaires à la transformation d'*Agrobacterium* (voir en 3.2).

La transformation génétique de plantes a été rendue possible grâce à des gènes marqueurs sélectionnables, comme les gènes de la résistance aux antibiotiques (voir en 3.4.2) et, récemment, grâce à des gènes qui codent pour des caractères culturaux. Des caractères comme la résistance à des viroses (section 4.1), à des insectes nuisibles (section 4.2), à la contamination par des métaux lourds (section 4.3), à des herbicides (section 4.4) ainsi qu'à des mycoses (section 4.5) ont été transférés à des systèmes végétaux modèles comme *N. tabacum*, *P. hybrida*, *Lycopersicon esculentum* (tomate), et *Arabidopsis thaliana*.

L'application du génie génétique à des espèces forestières (conifères et feuillus) ouvre de nouvelles possibilités sur la régulation, l'expression et l'amélioration génétique. Cependant, peu de travaux ont été faits à ce jour sur des espèces forestières (section 5). De telles espèces génétiquement transformées n'ont été obtenues que chez le peuplier (*Populus* spp.), le noyer (*Juglans regia*), le pommier (*Malus pumila*) ainsi que le margousier à feuilles de frêne (*Azadirachta indica*) (section 5.1). Malgré leur mise au point avec d'autres systèmes (mammifères, bactéries, levures et plantes vivrières), il y a loin d'ici à ce que les techniques qui conduiront à des progrès dans ce domaine de recherche soient appliquées à des espèces forestières.

Le présent rapport d'information devrait aider les chercheurs en foresterie à se faire une idée des progrès les plus récents dans le domaine du génie phytogénétique ainsi qu'à mesurer le potentiel de cette recherche lorsqu'elle sera appliquée à des espèces forestières.

2. PRINCIPALES NOTIONS ET DES DÉFINITIONS

2.1 *Définitions*

La confusion qui entoure la terminologie est souvent une caractéristique des domaines de recherche en évolution rapide. Afin d'atténuer ce problème, nous définirons ici quelques termes généraux. La première expression, qui a le sens le plus étendu, est la *manipulation génétique* : cela comprend toute manipulation ou modification possible du génome d'un organisme. La manipulation génétique s'applique à la multiplication des plantes, à l'hybridation somatique ainsi qu'à la transformation génétique. La *transformation génétique* a un sens plus restreint; elle fait référence au transfert et à l'intégration d'ADN exogène dans le génome d'un organisme. Cela se fait avec ou sans isolement ou modification des gènes et comprend la transformation chromosomique, la tumorigenèse causée par *Agrobacterium* ainsi que le *génie génétique*. Dans cet ouvrage, cette dernière expression fera référence à l'introduction d'un fragment d'ADN modifié dans le génome d'un organisme vivant afin de produire délibérément l'apparition d'un caractère spécifique. L'organisme peut ou non être régénéré dans sa forme originale.

2.2 *Grandes étapes de la phytobiologie moléculaire et du génie phytogénétique*

La première indication de ce type de manipulation génétique a paru dans un article de Wullems et al. (1981). Dans leur étude, ces chercheurs ont greffé des tératomes de *N. tabacum* (tissus tuméreux différenciés qui sont produits par transformation d'*A. tumefaciens*) sur la tige de plants normaux de *N. tabacum* afin d'obtenir des fleurs fertiles et des semences. Les gènes transférés n'étaient pas modifiés et les plantes régénérées étaient essentiellement des chimères. L'ADN transféré a été transmis aux descendants. Ces travaux ont été précédés de la régénération de *N. tabacum* transgéniques obtenue des racines chevelues transformées par *Agrobacterium rhizogenes* (Ackermann, 1977); cependant, la recherche d'Ackermann est passée presque inaperçue à l'époque, faute de connaître la nature de la transformation opérée par *A. rhizogenes*. C'est seulement en 1983 que la première indication critique de travaux de génie phytogénétique a paru (Barton et collab., 1983). Alors, un gène modifié, situé sur l'ADNt du plasmide Ti (tumour-inducing) d'*A. tumefaciens*, avait été introduit dans *N. tabacum*. Des plantes transgéniques (morphologiquement) normales avaient pu être régénérées et l'ADN introduit avait été transmis aux descendants selon les règles de la génétique mendélienne.

Des accomplissements scientifiques précurseurs avaient ouvert la voie à ces percées technologiques. Le tableau 1 énumère ce que les auteurs croient être quelques unes parmi les étapes les plus importantes de l'évolution de la phytobiologie moléculaire et du génie phytogénétique. La recherche fondamentale sur *Agrobacterium* a apporté les connaissances nécessaires afin que l'on puisse récupérer des plantes transgéniques, grâce à ce mécanisme naturel de transfert des gènes. D'autres instruments essentiels de modification des plantes vivrières sont apparus, et une bonne connaissance de la structure génétique des plantes a été acquise. Cependant, on connaît peu la biochimie des plantes, ses rapports avec l'expression génétique et la façon que ces principes déterminent la productivité et la qualité des plantes.

Tableau 1. Étapes importantes en génie phytogénétique

1907	Découverte de l'agent responsable de la tumeur du collet, *Agrobacterium tumefaciens* (Smith et Townsend, 1907)
1930	Découverte de l'agent responsable de la maladie capillaire des racines, *Agrobacterium rhizogenes* (Riker et collab., 1930)
1974	Découverte de gros plasmides chez *A. tumefaciens* (Zaenen et collab., 1974)
1975	Identification des plasmides Ti comme responsables de l'induction de tumeurs chez des plantes (Van Larebeke et collab., 1975; Watson et collab., 1975)
1977	Régénération de plantes de *N. tabacum* à partir de racines transformées par *A. rhizogenes* (Ackermann, 1977) Isolement pour la première fois d'un gène de plante (grande sous-unité de la biphosphate de ribulose carboxylase dans les génomes de chloroplastes) chez *Zea mays* (Coen et collab., 1977) Indication d'une transformation génétique par l'ADNt de plasmides Ti d'*A. tumefaciens* dans des tissus végétaux (Chilton et collab., 1977)
1981	Récupération d'une plante génétiquement transformée (Wullem et collab., 1981)
1983	Manipulation phytogénétique au moyen d'un ADNt modifié (Barton et collab., 1983) Manipulation phytogénétique avec des gènes hybrides bactériens fonctionnels (Fraley et collab., 1983; Herrera-Estrella et collab., 1983)
1985	Transformation génétique de chloroplastes de plante (De Block et collab., 1985) Transfert de la tolérance à un herbicide à des *N. tabacum* transgéniques (Comai et collab., 1985) Présence de «silencers» et d'activateurs de gène dans les plantes (Timko et collab., 1985)
1987	Transfer génique dirigé chez des plantes (Wirtz et collab., 1987)
1988	Régénération d'une monocotylédone transgénique obtenue par électroporation de protoplastes (*Zea mays*) (Rhodes et collab., 1988)

3. MÉTHODES DE TRANSFORMATION GÉNÉTIQUE

3.1 Introduction

De grands progrès ont été accomplis en génie phytogénétique, et nombre de méthodes de transformation ont été mises au point en plus de la transformation obtenue grâce à *A. tumefaciens*. L'intégration stable d'ADN introduit a été obtenue avec des fragments isolés d'ADN, de l'ADN génomique total, des chromosomes et même des noyaux isolés. Cela diffère profondément du transfert génétique transitoire où l'ADN n'est pas intégré dans le génome des cellules végétales, mais est plutôt exprimé pendant une assez brève durée avant d'être perdu. Le transfert de gènes transmis par l'entremise de virus (CaMV, géminivirus), où les gènes sont maintenus par réplication extrachromosomique (Davies et collab., 1987; Gronenborn, 1987), devrait être rangé dans cette catégorie. L'évaluation rapide de l'expression génétique possible par suite de l'introduction d'un nombre très élevé de copies dans des cellules hôtes, constitue le grand avantage de l'expression génétique transitoire. Il ne sera pas question de ce type d'expression dans ce rapport.

Un nouveau type de transformation génétique a été obtenu par la combinaison du transfert de gènes transmis par *Agrobacterium* avec l'infection virale. Les génomes de certains virus ont été clonés dans l'ADNt de vecteurs plasmidiques Ti d'*A. tumefaciens*, et ont été transférés à des cellules végétales selon des méthodes d'inoculation soit bactérienne, soit virale. Il suffit de quelques cellules génétiquement transformées pour assurer l'infection virale de l'ensemble de la plante (Grimsley et Bisaro, 1987). On peut considérer ce phénomène comme une amplification des phénotypes des cellules transformées, mais les plantes ne constituent pas des organismes transgéniques.

Deux avenues s'offrent pour la transformation génétique. Un transfert génétique direct peut être obtenu au moyen de méthodes qui permettent d'introduire directement l'ADN dans la cellule végétale sans aucun intermédiaire. Le transfert génétique indirect nécessite un organisme intermédiaire comme, par exemple, les phytopathogènes *A. tumefaciens* et *A. rhizogenes*, afin de transmettre l'ADN étranger au génome de la plante. Cet ADN doit d'abord être introduit dans l'organisme intermédiaire (*Agrobacterium*), qui, à son tour, place l'ADN dans le génome de la plante en transmettant l'ADNt.

3.2 Méthodes de transformation directe des gènes

Les méthodes de transformation directe permettent de contourner les limites imposées par le spectre d'activité des différentes espèces d'*Agrobacterium*. Cela devient important dans le cas de la transformation des monocotylédones, les graminées en particulier, justement parce que ces espèces ne sont pas comprises dans le spectre d'activité d'*A. tumefaciens*. Avec la plupart de ces méthodes, on utilise des protoplastes qui rendent possible une régénération des plantes. Exception faite des méthodes efficaces comme la micro-injection, il est nécessaire d'opérer une sélection en fonction de l'ADN introduit au moyen d'un gène marqueur (comme celui de la résistance aux antibiotiques) pour récupérer les cellules transformées.

3.2.1 Introduction au moyen du polyéthylène glycol ou de l'alcool polyvinylique

Il est possible de perméabiliser les membranes de protoplastes végétaux au moyen de polyéthylène glycol (P.E.G.) ou de l'alcool polyvinylique (P.V.A.L.) afin de favoriser l'absorption passive, dans la cellule végétale, d'ADN nu ou d'ADN précipité (avec des ions calcium) (Freeman et collab., 1984; Chen et collab., 1987; Junker et collab., 1987; Negrutiu et collab., 1987). Certains facteurs comme la concentration du P.E.G. ou du P.V.A.L. ainsi que la concentration du vecteur et de l'ADN porteur agissent sur les taux de transformation (Shillito et collab., 1985). Une transformation stable a été obtenue chez *N. tabacum* (Kohler et collab., 1987a), *Saccharum* spp. (Chen et collab., 1987), *Triticum monococcum* (Lörz et collab., 1985), *Vigna aconitifolia* (Kohler et collab., 1987a, b), *Oryza sativa* (Uchimiya et collab., 1986), *P. hybrida* (Kruger-Lebus et Potrykus, 1987), *Lolium multiflorum* (Lörz et collab., 1985), *Brassica campestris* (Paszkowski et collab., 1986) ainsi que *Nicotiana plumbaginifolia* (Negrutiu et collab., 1987). Les fréquences de transformation étaient assez faibles, de l'ordre de 10^{-4} à 10^{-5}; cependant, on a pu obtenir des fréquences de 10^{-4} à 10^{-3} après optimisation des facteurs chez *P. hybrida* (Kruger-Lebus et Potrykus, 1987). Une expression transitoire a été obtenue

chez *Zea mays*, *Hordeum vulgare*, *O. sativa*, *Secale cereale* (Junker et collab., 1987) ainsi que chez *T. monococcum* (Weer et Lörz, 1986). Des plantes transgéniques ont été obtenues chez *P. hybrida* (Kruger-Lebus et Potrykus, 1987) ainsi que *Dactylis glomerata* (Horn et collab., 1988).

3.2.2 Électroporation

L'électroporation est une technique qui sert à accroître la fréquence de transformation obtenue au moyen des méthodes par P.E.G. et P.V.A.L. (Shillito et collab., 1985; Potrykus et collab., 1987). Le fait de soumettre des protoplastes à une impulsion électrique sous tension élevée, en présence d'ADN et de P.E.G., accroît l'entrée de l'ADN dans les protoplastes végétaux et modifie la perméabilité des membranes cellulaires (Shillito et collab., 1985; Potrykus et collab., 1987) (figure 1). Cette méthode a permis d'obtenir une intégration stable (Langridge et collab., 1985, Fromm et collab., 1986, Bradshaw et collab., 1987, Hauptmann et collab., 1987; Rhodes et collab., 1988) et une expression transitoire (Ou-Lee et collab., 1986; Bradshaw et collab., 1987; Guerche et collab., 1987a; Thornburg et collab., 1987); les fréquences de transformation sont de l'ordre de 10^{-4} à 10^{-3}. On doit obligatoirement utiliser des protoplastes même si cela limite le nombre d'espèces végétales qu'on peut transformer par électroporation. On a réussi à régénérer des plantes transgéniques à partir de protoplastes électroporés chez *Zea mays* (Rhodes et collab., 1988), *N. tabacum* (Shillito et collab., 1985; Tyagi et collab., 1989), *O. sativa* (Toriyama et collab., 1988; Zhang et collab., 1988; Shimamoto, 1989), B. napus (Guerche et collab., 1987b) et *Lactuca sativa* (Chupeau et collab., 1989).

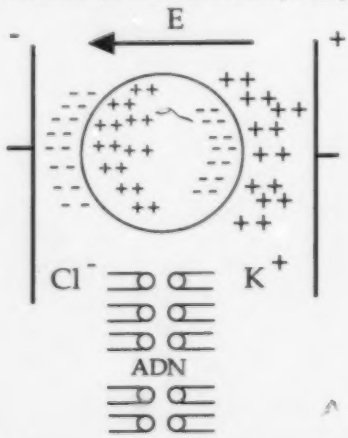


Figure 1. Électroporation de protoplastes végétaux. Des protoplastes (cercle) sont soumis à une impulsion électrique (E) qui perméabilise les membranes cellulaires. L'ADN pénètre facilement par les pores formés par le courant électrique, et peut être intégré dans le génome des cellules végétales par la machinerie de l'hôte.

3.2.3 Introduction par l'intermédiaire de liposomes

Cette méthode nécessite que l'ADN soit encapsulé dans une vésicule phospholipidique, le liposome, qui est amenée à fusionner avec des protoplastes végétaux par un traitement cationique ou au P.E.G. (Fraley, 1983; Caboche et Deshayes, 1984; Deshayes et collab., 1985; Rosenberg et collab., 1988). L'avantage principal des liposomes est d'assurer la protection des acides nucléiques contre la dégradation par des nucléases contenues dans le milieu ou dans le cytoplasme. On a obtenu des fréquences de transformation de 10^{-4} à 10^{-5} (Fraley, 1983; Caboche et Deshayes, 1984; Deshayes et collab., 1985). Cette méthode a été appliquée avec succès à des protoplastes de *N. tabacum*; des plantes transgéniques ont été régénérées. Des analyses génétiques ont indiqué que les gènes marqueurs avaient été transmis aux descendants (Caboche et Deshayes, 1984; Deshayes et collab., 1985).

3.2.4 Introduction par transmission avec des sphéroplastes

La fusion de protoplastes végétaux avec des sphéroplastes préparés à partir d'*Escherichia coli* ou d'*A. tumefaciens* a été obtenue avec l'application de P.V.A.L. ou de P.E.G. De l'ADN contenu à l'intérieur d'*E. coli* ou d'*A. tumefaciens* a été intégré dans le génome protoplastique. Cette méthode a été appliquée à la transformation de *Vinca rosea* (Hasezawa et collab., 1981, 1983) avec des sphéroplastes d'*E. coli* et d'*A. tumefaciens* (Matsui et collab., 1983), de *B. napus* avec des sphéroplastes d'*E. coli* (Tanaka et collab., 1984), de *N. tabacum* avec des sphéroplastes d'*A. tumefaciens* et d'*E. coli* (Hain et collab., 1984) et d'*O. sativa* avec des sphéroplates d'*A. tumefaciens* (Baba et collab., 1986). On a obtenu des fréquences de transformation de 10^{-4} à 10^{-3} (Hain et collab., 1984; Baba et collab., 1986), mais on n'a pas pu régénérer de plante transgénique. L'introduction d'une quantité d'ADN supérieure à la quantité souhaitée constitue un inconvénient de cette méthode. Cela pourrait conduire à de la mutagénèse et à de la recombinaison génétique, au détriment de l'organisme, comme il a été montré avec la transformation bactérienne (Grist et Butler, 1983).

3.2.5 Micro-injection

La micro-injection est une technique qui permet de livrer directement et précisément de l'ADN dans une cellule végétale ou même dans le noyau d'une cellule. L'ADN peut être introduit dans le noyau de protoplastes isolés (Crossway et collab., 1986; Reich et collab., 1986a, b, c; Miki et collab., 1987) ou dans des cellules végétales (Crossway et collab., 1986; Neuhaus et collab., 1987) au moyen d'une microseringue. Lorsqu'il est question d'injection dans le noyau, on peut utiliser des colorants en combinaison avec la microscopie par fluorescence (Reich et collab., 1986a) ou avec la microscopie à fond clair (Crossway et collab., 1986) afin de voir le noyau. Les protoplastes peuvent être tenus dans une pipette pour les retenir ou être imprégnés dans un agent gélifiant. Cette méthode a pour principaux avantages la précision de l'introduction de l'ADN et des fréquences de transformation extrêmement élevées. Des fréquences de transformation de 15 % à 26 % ont été obtenues chez *Medicago sativa*, de 66 % chez *B. napus* et de 14 % chez *N. tabacum*, par micro-injection dans le noyau de protoplastes (Crossway et collab., 1986; Reich et collab., 1986b; Miki et collab., 1987). Avec la micro-injection dans le cytoplasme de protoplastes de *N. tabacum*, on a obtenu 6 % de transformation (Crossway et collab., 1986). Dernièrement, la micro-injection dans des embryons dérivés de microspores de *B. napus* a conduit à des fréquences de transformation de 10 à 30 % (Neuhaus et collab., 1987). Des plantes transgéniques ont été obtenues chez *N. tabacum* (Crossway et collab., 1986; Neuhaus et collab., 1987) et chez *B. napus* (Neuhaus et collab., 1987). À ce jour, la micro-injection demeure une méthode fastidieuse et l'équipement nécessaire coûte cher. En outre, seulement un nombre limité de cellules peut être micro-injecté au cours d'une même expérience.

3.2.6 Micro-projection

La micro-projection est une technique relativement récente qui fait appel à des microprojectiles qui sont de petites particules de tungstène (Klein et collab., 1987, 1988a,b,c) ou d'or (Christou et collab., 1988, 1989) enduites d'ADN, qui sont accélérées dans un microcanon à particules (propulsion assurée à l'air, au gaz, à la poudre ou à l'électricité) jusqu'à des vitesses qui permettent leur pénétration dans des cellules intactes (figure 2; Sanford et collab., 1987; Morikawa et collab., 1989, Oard et collab., 1990). Les facteurs qui influencent la transformation sont notamment le volume et la taille des microprojectiles, la quantité d'ADN, la présence de $CaCl_2$ et de spermidine ainsi que l'intensité du vide (Klein et collab., 1988a,b,c). On a montré une expression transitoire de l'ADN transféré chez de nombreuses espèces végétales (chez *Oryza sativa* : Bruce et collab., 1989; Oard et collab., 1990; McElroy et collab., 1990 et Wang et collab., 1988; chez *Hordeum vulgare* : Mendel et collab., 1989 et Kartha et collab., 1989; chez *Zea mays* : Klein et collab., 1988a,b,c, 1989a,b; Ludwig et collab., 1990 et Oard et collab., 1990; chez *Triticum aestivum* : Wang et collab., 1988 et Oard et collab., 1990; chez *L. esculentum* : Twell et collab., 1989; chez *Alium cepa* : Klein et collab., 1987). Des plantes transgéniques ont été obtenues chez *Glycine max* (McCabe et collab., 1988; Christou et collab., 1989), chez *N. tabacum* (Klein et collab., 1988, Tomes et collab., 1990) ainsi que chez *Gossypium hirsutum* (Finer et McMullen, 1990). L'utilisation de cellules et de tissus intacts constitue un avantage majeur de cette méthode de micro-projection car on peut ainsi sauter les étapes de cultures de tissus. On a obtenu des transformations de chloroplastes (Boynton et collab., 1988) et de mitochondries (Johnston et collab., 1988), au moyen de la micro-projection, chez *Chlamydomonas reinhardtii* et chez *Saccharomyces cerevisiae*, respectivement.

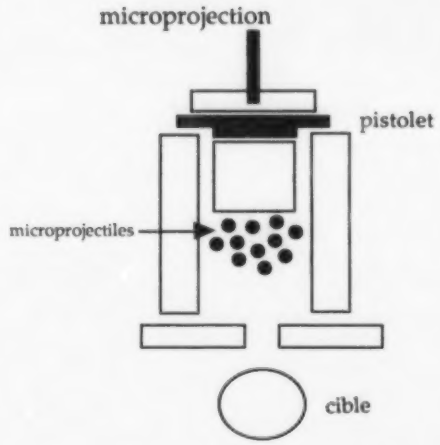


Figure 2. Microprojection d'ADN dans des cellules ou des tissus végétaux. Des microprojectiles de tungstène ou d'or sont enduits d'ADN et projetés par décharge électrique, à poudre ou à gaz. Les microprojectiles pénètrent dans les tissus et l'ADN peut être intégré dans le génome des cellules.

3.2.7 Macroinjection

La macroinjection correspond à l'injection d'ADN, au moyen d'une seringue, dans les parties florales d'une plante. On n'a rapporté de transformations réussies qu'une fois (De La Pena et collab., 1987) : des plantes transgéniques de *Secale cereale* avaient été obtenues par injection d'ADN (plasmide et gène NPT II) dans de jeunes talles floraux, qui sont sensibles à un traitement à la colchicine ou à la caféine, ce qui donne à penser qu'ils sont aussi perméables à d'autres molécules comme l'ADN (Puertas et collab., 1984). La transformation de descendants au stade de plantule, obtenus des plantes macroinjectées, a été vérifiée par détection de la présence du gène NPT II et la résistance à la kanamycine, mais la fréquence de transformation était assez faible (0,3 %). L'avantage de la macroinjection, si les résultats étaient répétables, serait qu'elle permet de contourner les limites des méthodologies associées aux cultures de tissus en vue de la récupération de plantes céréalières transgéniques.

3.2.8 Introduction par microfaisceau-laser

Cette méthode prévoit qu'on perce les parois des cellules végétales au moyen d'un microfaisceau laser ultraviolet, ce qui permet à l'ADN de pénétrer dans la cellule (Weber et collab., 1988, 1989a,b). On a montré qu'il y avait une expression transitoire chez des embryons dérivés de microspores de *B. napus* (Weber et collab., 1989b). On n'a pas rapporté de preuve directe d'une transformation stable. Par conséquent, il n'y a pas de plante transgénique régénérée. L'avantage de cette méthode est qu'elle permet d'utiliser des cellules intactes.

3.2.9 Introduction par l'intermédiaire du tube pollinique

Cette méthode prévoit le transfert d'ADN exogène par l'intermédiaire du tube pollinique lors de la germination de ce dernier. Cet effet a été obtenu chez *Oryza sativa*, où le stigmate a été coupé d'un floret et qu'une solution d'ADN a été déposée sur le sommet du stylet coupé (Duan et Chen, 1985; Luo et Wu, 1989). Il a été avancé que l'ADN pouvait atteindre l'ovule en empruntant le tube pollinique. Des plants de riz transgéniques ont été régénérés à partir de la descendance de plantes traitées à l'ADN; cependant, les résultats ont soulevé une vive controverse et ils sont contestés par certains groupes.

3.2.10 Introduction par imbibition des semences

Cette méthode n'a pas encore donné d'indication définitive d'une transformation stable. Elle consiste en l'imbibition de semences dans une solution aqueuse d'ADN jusqu'à ce que l'ADN pénètre dans les semences. Cette méthode a été testée sur des semences d'Avena sativa, d'*Hordeum vulgare*, d'*Oryza sativa*, de *Triticum monococcum*, de *Secale cereale*, de *Zea mays*, de *Phaseolus coccineus*, de *Pisum sativum* et de *Vicia faba* : on n'a observé qu'une expression transitoire des gènes (Topfer et collab., 1989).

3.2.11 Introduction par l'intermédiaire de fibres de carbure de silicium

On a utilisé des fibres microscopiques de carbure de silicium pour introduire de l'ADN exogène dans des cellules de Z. *mays* et de *N. tabacum* (Kaeppler et collab., 1990). Cette méthode est fondée sur la microperforation de cellules mises en présence des microfibres dans un milieu agité en vortex; l'ADN pénètre dans les cellules et on obtient une expression subséquente des gènes introduits. À ce jour, il n'y a pas eu de tissu transgénique récupéré.

3.3 Transfert indirect de gènes

Agrobacterium a le potentiel de transférer de l'ADN et d'assurer son intégration dans des génomes végétaux au moyen d'un mécanisme unique de transfert de gènes entre règnes différents. Cette propriété a été exploitée à des fins de génie génétique appliqué à des plantes avec *A. tumefaciens* et *A. rhizogenes*. Ces deux dernières sont des bactéries phytogènes; elles appartiennent aux Rhizobiacées. *A. tumefaciens* est responsable de la tumeur du collet et *A. rhizogenes* est responsable de la maladie des racines chevelues (Lippincott et collab., 1981). Ces deux espèces ont une action pathogène sur un nombre élevé de gymnospermes et d'angiospermes dicotylédones (De Cleene et De Ley, 1976, 1981), mais les angiospermes monocotylédones ont une résistance naturelle à l'infection par *Agrobacterium* (De Cleene, 1985).

3.3.1 Transformation génétique naturelle par *Agrobacterium*

Ces maladies sont attribuables aux gros plasmides Ti (150-250 kilobases) observés chez *Agrobacterium* ainsi que par les plasmides inducteurs de racines (Ri) d'*A. rhizogenes* (Van Larebeke et collab., 1975; Watson et collab., 1975; White et

Nester, 1980a,b). Ces plasmides codent pour les caractères pathogènes et, lorsqu'ils sont transférés d'une *Agrobacterium* à une autre ou même à *Rhizobium*, ils conservent leur potentiel pathogène spécifique (Watson et collab., 1975). Les plasmides Ti sont classés dans quatre catégories : plasmides de nopaline, d'octopine, d'agropine et de succimanopine (Petit et collab., 1983; Nester et collab., 1984; Eckes et collab., 1987), et les plasmides Ri sont classés dans trois catégories : plasmides de mannopine, d'agropine et de cucumopine (Birot et collab., 1987) (tableau 2). Ces composés ou opines sont des acides aminés ou des dérivés de sucres produits spécifiquement par des tissus tumoraux végétaux; ils peuvent être utilisés par Agrobacterium comme source unique de carbone et d'azote (Petit et collab., 1983; Nester et collab., 1984, Eckes et collab., 1987).

3.3.1.a Rôle de l'ADNt

La tumeur du collet et la maladie des racines chevelues résultent de l'expression de gènes de synthèses d'hormones (oncogènes, oncogénécité) situés sur un fragment des plasmides Ti ou Ri transférés et intégrés dans le génome de la plante (revu par Weiler et Schroder, 1987, Spena et collab., 1987 et Birot et collab., 1987) et qu'on désigne par ADNt ou ADN transféré (Chilton et collab., 1977, 1982). En plus des gènes de synthèse d'hormones, on trouve sur l'ADNt des gènes de synthase de l'opine qui sont exprimés dans les tissus transformés et qui produisent des opines spécifiques qui correspondent à la classe des plasmides Ti (Nester et collab., 1984; Eckes et collab., 1987). La figure 3 montre un schéma de l'ADNt.

Les gènes de synthèse d'hormones qui se trouvent dans l'ADNt des plasmides Ri et Ti ont été isolés et caractérisés. Ils codent pour des enzymes qui participent à la biosynthèse d'auxines et de cytokinines (Weiler et Schroder, 1987). Ces gènes ont été utilisés lors des expériences de transformation génétique visant à modifier l'équilibre de régulation de la croissance de tissu végétal, ce qui a eu pour effet de faire varier les caractéristiques de la croissance (Medford et collab., 1989).

Il peut y avoir délétion de gènes à l'intérieur de l'ADNt sans qu'il y ait d'effet sur le traitement, le transfert et l'intégration. Cependant, deux segments répétés de 25 paires de bases à la frontière de tous les segments d'ADNt sont nécessaires au transfert efficace. Il a été montré que la frontière de droite est essentielle alors que celle de gauche peut être amputée sans empêcher le transfert de l'ADNt (Peralta et Ream 1985; Peralta et collab., 1986; Wang et collab., 1987a). Sur les plasmides de l'octopine, par exemple, le pTiA6NC, il a été observé qu'une séquence de 23 paires de bases, située juste à côté de la frontière de droite («over-

Tableau 2. Classification des plasmides Ti et Ri d'*Agrobacterium*

Classe	Opines synthétisées	Exemple	Groupe d'incompatibilité
	A. tumefaciens		
Octopine	Famille octopine + famille agropine	pTiA6 pTiB6S3 pTiAch5	Rh-1
Nopaline	Famille nopaline + agrocinopines A et B	pTiC58 pTiT37	Rh-1
Agropine	Famille agropine + agrocinopines C et D	pTiB0542	Rh-2
Succimanopine	Famille succimanopine	pTiAT181	?
	A rhizogenes		
Agropine	Famille agropine + agrocinopines A et B	pRiA4	Rh-3
Mannopine	Famille agropine (sauf agropine) + agrocinopines C + D	pRi8196	Rh-3
Cucumopine	Cucumopine	NCPPB2659	?

Note : La famille de l'octopine comprend l'octopine, l'acide octopinique, la lysopine et l'histopine; la famille de la nopaline comprend la nopaline et l'acide nopalinique; la famille de la succimanopine comprend la succimanopine, la succimanopine lactame et la succinopine lactame; la famille de l'agropine comprend l'agropine, la mannopine, l'acide mannopinique et l'acide agropinique. ? = indéterminé.

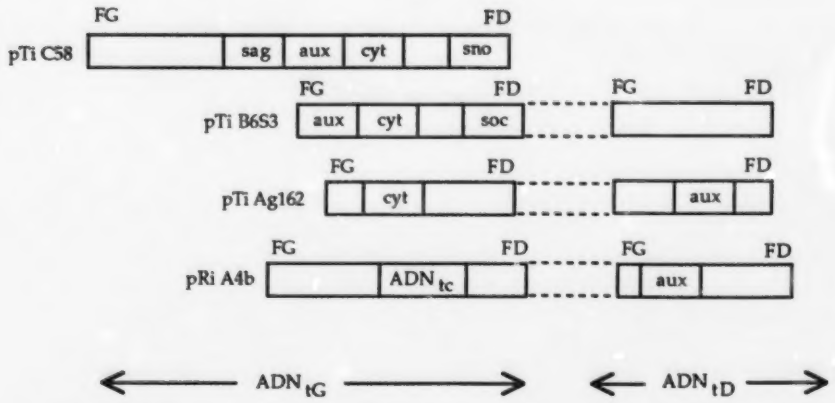


Figure 3. Structure de différents ADNt de plasmides Ti et Ri. ADN_{tG} = ADNt gauche, ADN_{tD} = ADNt droit, FG = frontière de gauche, FD = frontière de droite. Gènes de synthèse d'hormones : aux = synthèse d'auxine, cyt = synthèse de cytokinine. Gènes de synthèse des opines : sag = synthèse d'agropine, sno = synthèse de nopaline, soc = synthèse de l'octopine. ADNtc = ADN qui s'hybride avec l'ADN de la plante. Tiré et adapté de Nester *et al.* (1984).

drive»), stimulait la transmission de l'ADNt (Peralta et collab., 1986). De plus, il a été observé que le transfert de l'ADNt avec le pTiC58 de la nopaline est soumis à l'action des séquences situées à proximité de la frontière de droite et que les séquences situées à proximité de la frontière de gauche nuisent à ce transfert (Wang et collab., 1987a). Ces deux études conduisent à l'hypothèse d'un transfert polaire de l'ADNt à des cellules végétales.

Le mécanisme le plus probable du transfert de l'ADNt passerait par une cassure monocaténaire, à un site spécifique, des frontières, et par la production d'un ADNt à simple brin (brin T) qui est obtenu par la suppression de l'ancien brin (Yanofsky et Nester, 1986; Yanofsky et collab., 1986; Stachel et collab., 1987; Wang et collab., 1987b; Christie et collab., 1988; Veluthambi et collab., 1988). Une autre façon de voir le phénomène serait la cassure, sur les deux brins (cassure bicaténaire), à un site spécifique, de la frontière de droite, et la production d'un ADNt à deux brins (ADN bicaténaire) linéaires ou circulaires (Koukolikova-Nicola et collab., 1985; Alt-Moerbe et collab., 1986; Jayaswal et collab., 1987; Veluthambi et collab., 1987, Yamamoto et collab., 1987). Toutefois, il est possible que ce type de molécules soit le fait des méthodes d'expérimentation et qu'elles ne participent pas au transfert de l'ADNt à la cellule végétale. Par surcroît, la fréquence de tels phénomènes est relativement faible (Koukolikova-Nicola et collab., 1985).

Certains gènes de synthèse d'hormones qui sont situés sur l'ADNt ont également un rôle important dans le contrôle du spectre d'activité d'*A. tumefaciens* (Yanofsky et collab., 1985a,b). Ces gènes ont une action au niveau de la formation des tumeurs et non au niveau de la transformation.

Il importe d'observer que les gènes de l'ADNt sont devenus exprimés dans la cellule végétale et non dans la bactérie. Le déséquilibre hormonal qui résulte de la présence des gènes d'ADNt dans les tissus végétaux est à l'origine d'une pathologie : formation de tumeurs dans le cas des plasmides Ti et de racines chevelues dans le cas des plasmides Ri. Les opines produites dans la tumeur ou dans les racines chevelues rendent possible la colonisation des tissus végétaux. Les opines font la promotion de la conjugaison d'*Agrobacterium* et facilitent le transfert des plasmides Ti ou Ri.

3.3.1.b Fonction de la région VIR

Une autre région, qu'on appelle la région de virulence ou VIR, qui mesure environ 35 kilobases et est située sur les plasmides Ti ou Ri, est essentielle au transfert de l'ADNt au génome de la plante. Elle agit *in trans* (d'un plasmide à un autre) pour l'ADNt (Hoekema et collab., 1983). Les gènes de la région VIR des plasmides Ti ou Ri sont responsables du traitement et du transfert dans la cellule végétale de l'ADNt. Ils participent aussi à la spécificité de l'action des plasmides Ti ou Ri par rapport à des hôtes (Loper et Kado, 1979; Thomashow et collab., 1980, Knauf et collab., 1984). On a établi l'existence de six opérons VIR (VIR A, B, C, D, E et G) sur les plasmides Ti de

l'octopine (Stachel et Nester, 1986) ainsi que de la nopaline (Rogowsky et collab., 1987). On a établi une homologie entre les régions VIR des plasmides Ti et des plasmides Ri de l'octopine et de la nopaline (Risuelo et collab., 1982; Jouanin, 1984; Knauf et collab., 1984; Janssens et collab., 1986; Rogowsky et collab., 1987). On a déterminé l'existence d'un septième opéron, le VIR F, sur les plasmides Ti de l'octopine; celui-ci n'a pas d'équivalent avec les plasmides Ti des autres types (Stachel et Nester, 1986). Sur les plasmides Ti de la nopaline, la région VIR contient le locus tzs, qui code pour une enzyme de synthèse de la transzéatine chez *Agrobacterium* (Janssens et collab., 1986). Les loci VIR F et *tzs* sont induits par des exsudats végétaux.

Les opérons VIR A, B, D et G sont essentiels à l'induction de tumeurs. Les opérons VIR C, E et F sont nécessaires seulement chez certaines espèces végétales (Stachel et Nester, 1986; Rogowsky et collab., 1987). Les opérons VIR A et G sont exprimés constitutivement chez *Agrobacterium*, mais l'opéron VIR G peut être induit dans des conditions déterminées, comme en présence de composés phénoliques végétaux synthétisés à l'endroit d'une lésion, par épuisement du phosphate, et dans des milieux acides (Winans, 1990). Les opérons VIR B, C, D, E et F sont induits par coculture d'*Agrobacterium* avec des cellules végétales ou par incubation avec des composés phénoliques végétaux comme l'acétosyringone ou l'hydroxyacétosyringone (Stachel et collab., 1985a, 1986a; Stachel et Nester, 1986; Rogowski et collab., 1987). Certaines opines (octopine, nopaline, leucinopine et succimanopine), en combinaison avec l'acétosyringone, sont des inducteurs de gènes VIR (Veluthambi et collab., 1989).

On n'a pas encore entièrement déterminé les fonctions des gènes VIR, mais de forts indices expérimentaux suggèrent des fonctions possibles à la plupart d'entre eux. L'opéron VIR A, qui contient un ORF (cadre de lecture ouvert) (Melchers et collab., 1987), semble coder pour une protéine détectrice de phytomolécules-signal, qui est située sur la membrane interne (Stachel et Nester, 1986; Melchers et collab., 1987; Rogowsky et collab., 1987). Par ailleurs, la protéine VIR A activerait directement ou non la protéine VIR G. Ce dernier opéron comprend un ORF qui code pour une protéine de régulation positive qui active les autres gènes VIR (Stachel et Nester, 1986; Winans et collab., 1986; Rogowsky et collab., 1987). Le VIR A et le VIR G modifient à la spécificité du spectre d'activité. (Jin et collab., 1987; Leroux et collab., 1987).

D'autres opérons VIR sont davantage complexes, et il n'y a que quelques-unes des protéines correspondantes auxquelles on a attribué des fonctions potentielles. L'opéron VIR D possède cinq ORF (Porter et collab., 1987). On pense que les protéines VIR D1 et VIR D2 font partie d'une endonucléase spécifique à un site et qui coupe le brin inférieur de l'ADNt à ses frontières (Alt-Moerbe et collab., 1896; Stachel et collab., 1986b, 1987; Yanofsky et collab., 1986; Jayaswal et collab., 1987; Porter et collab., 1987; Howard et collab., 1989), ce qui produit la molécule du brin T chez *Agrobacterium* par remplacement. Le gène VIR D code pour une enzyme de déroulement de l'ADN qui est nécessaire pour couper l'ADNt à simple brin (Ghai et Das, 1989). L'opéron VIR E comprend deux ORF en pTiA6 et au moins cinq ORF en pTiC58 (Hirooka et collab., 1987; McBride et Knauf, 1988). Il a été établi que le produit génique VIR 2 se lie à l'ADN à simple brin et qu'il est situé dans le cytoplasme, sur les membranes internes et externes ainsi que dans les fractions périplasmiques d'*A. tumefaciens* induites par l'acétosyringone (Christie et collab., 1988; Das, 1988; Sen et collab., 1989). On croit que la protéine VIR E2 participe au traitement de l'ADNt et à la protection du brin T (Christie et collab., 1988). L'opéron VIR E influe sur la spécificité du spectre d'activité (Hirooka et Kado, 1986; McBride et Knauf, 1988). Toutefois, le VIR E n'est pas nécessaire, de manière stricte, pour la formation de tumeurs, et il peut être complémenté par coinfection avec une souche d'*A. tumefaciens* qui contient un opéron VIR E non défectueux (Gardner et Knauf, 1986)

L'opéron VIR B comprend 11 ORF (Ward et collab., 1988). Il y a des indices d'une association des produits géniques VIR B avec les membranes; cela pourrait indiquer que ces produits participent à la formation d'un complexe transmembranaire d'introduction de l'ADNt dans la cellule végétale. Les opérons VIR B1 à VIR B9 sont situés dans l'enveloppe cellulaire (Thompson et collab., 1988). Les opérons VIR B4 et VIR B11 contiennent eux aussi des séquences nécessaires à la fixation de l'ATP; cela vient renforcer l'idée d'un complexe d'introduction de l'ADNt (Thompson et collab., 1988). L'opéron VIR B exerce un effet sur la spécificité du spectre d'activité d'*A. tumefaciens* (Jin et collab., 1987).

Le locus VIR C contient deux ORF (Yanofsky et Nester, 1986); il agit sur le spectre d'activité (Srinivasan et collab., 1989). En outre, il donne lieu à une réaction d'hypersensibilité chez *Vitis* spp. et confère à la plante une résistance à l'induction de tumeurs par *A. tumefaciens* (Yanofsky et Nester, 1986).

Le tableau 3 donne un aperçu des fonctions des gènes VIR.

Tableau 3. Sommaire des fonctions possibles des gènes chromosomiques et de la virulence qui participent à la transformation par *Agrobacterium*

	Fonctions
Gènes chromosomiques *chv A, chv B, att, exoC ros, chv D, chv E* «chimiotactisme»	Fixation à la cellule végétale *Régulation des gènes VIR* *Chimiotactisme* Agrobacterium
Gènes de la virulence	
VIR A VIR G	Chimiorécepteur, activateur
VIR B	Complexe transmembranaire
VIR C	Spécificité du spectre d'activité
VIR D	Endonucléase spécifique au site et enzyme de déroulage de l'ADN
VIR E	Traitement et protectin de l'ADNt
VIR F	Spécificité du spectre d'activité
VIR G	Régulateur positif des VIR B, C, D, E, F ET *tzs*

3.3.1.c Fonctions des gènes chromosomiques d'*Agrobacterium*

L'induction par *Agrobacterium* de tumeurs chez des plantes dépend de nombreux facteurs. La plante hôte doit être susceptible à *Agrobacterium* qui, de son côté, doit être virulent chez l'hôte. Le spectre d'activité d'*Agrobacterium* dépend de l'expression du gène d'ADNt de synthèse d'hormone dans la cellule transformée, de la région de virulence sur les plasmides Ti ou Ri ainsi que des gènes chromosomiques d'*Agrobacterium*. Les étapes dirigées par le chromosome bactérien (Matthysse et collab., 1981; Matthysse, 1983) sont la fixation lâche et réversible d'*Agrobacterium* à des sites spécifiques sur la cellule végétale hôte, suivie de la synthèse de fibrilles cellulosiques par *Agrobacterium* qui viennent envelopper la cellule végétale. Cette étape est irréversible et *Agrobacterium* est fixée fermement à la cellule hôte. Enfin, des grappes d'*Agrobacterium* sont prisonnières d'une toile de fibrilles cellulosiques.

Les gènes chromosomiques qui participent à ces étapes ont été identifiés et cartographiés par mutagénèse par transposon. Les gènes *chvA* et *chvB* (Douglas et collab., 1985) participent à la synthèse des fibrilles cellulosiques, et les mutants par rapport à ces loci sont défectueux par rapport à la fixation ferme sur les cellules hôtes. Le locus *chvB* code pour la synthèse de la ß-1,2-glucane qui est trouvée dans les espaces périplasmiques et extracellulaires (Zorreguieta et collab., 1988). La mobilité d'*Agrobacterium* et la capacité qu'elle a de transférer le plasmide Ti en conjugaison sont en partie sous l'influence de ces gènes. Deux autres gènes participent aussi à la fixation d'*Agrobacterium* sur la plante. Le gène Att est associé à la synthèse de polypeptides qui participent à la formation de sphéroplastes d'*Agrobacterium* (Matthysse 1987; Robertson et collab., 1988). Relativement à ce gène, les mutants ne parviennent pas à se fixer aux cellules végétales. Le dernier gène considéré est l'*exoC* (ou *pscA*); il code pour la synthèse de la succinoglycane, qui est nécessaire à la synthèse des fibrilles cellulosiques (Cangelosi et collab., 1987; Thomashow et collab., 1987).

Les gènes chromosomiques participent aussi à d'autres phénomènes que la fixation d'*Agrobacterium* à la cellule végétale. Le gène ros règle l'expression des gènes VIR (Close et collab., 1985). Ce locus agit par un régulateur négatif des gènes VIR; les mutants ont des niveaux d'expression VIR qui sont 300 fois supérieurs au niveau normal.

En outre, la morphologie des colonies d'*Agrobacterium* est également modifiée. Les gènes *chvE* et *chvD* sont également des régulateurs positifs des gènes VIR. Leur inactivation par mutagénèse due au transposon atténue la virulence d'*Agrobacterium* (Huang et collab., 1990). D'autres gènes chromosomiques sont responsables du chimiotactisme positif d'*Agrobacterium* face à la plante, mais ces gènes n'ont pas encore été cartographiés ou caractérisés (Ashby et collab., 1987; Parke et collab., 1987; Loake et collab., 1988). Le système de chimiotactisme est fondé sur l'attraction exercée sur les bactéries par des substances comme les sucres, les acides aminés (Loake et collab., 1988) et les composés phénoliques qui sont libérés par la plante (Parke et collab., 1987). Les composés phénoliques comme l'acétosyringone et l'hydroxyacétosyringone sont aussi des substances à l'origine d'un chimiotactisme qui participe au mécanisme codé par le plasmide Ti et, apparemment, par les gènes VIR A et G (Ashby et collab., 1987, 1988; Shaw et collab., 1988).

En outre, les plasmides Ti et Ri contiennent des gènes bactériens qui participent au catabolisme de l'opine, au transfert des plasmides par conjugaison, à des fonctions de réplication, à la sensibilité à l'agrocine et à l'exclusion des phages (Nester et Kosuge, 1981).

La figure 4 montre le processus de transformation génétique d'*A. tumefaciens* qui s'est fait par l'intermédiaire du plasmide Ti.

Tableau 4. Plasmides Ti modifiés et désarmés, ainsi que leur origine

Plasmide Ti désarmé	Plasmide Ti original	Type	Référence
pGV3850	pTiC58	Cointégré	Zambrysky et collab. (1983)
pGV2260	pTiB6S3	Cointégré	Deblaere et collab. (1985)
pMP90	pTiC58	Binaire	Koncz et Schell (1986)
pAL4404	pTiAch5	Binaire	Hoekema et collab. (1983)
pEHA1001	pTiBo542	Binaire	Hood et collab. (1986)
pTiB6S3-SE	pTiB6S3	Cointégré	Fraley et collab. (1985)
pTiB6S3-NE	pTiB6S3	Binaire	Rogers et Klee (1987)
pTiT37-SE	pTiT37	Cointégré	Rogers et Klee (1987)

3.3.2 Génie phytogénétique avec des plasmides Ti ou Ri d'*Agrobacterium*

Des plasmides Ti et Ri ont été utilisés comme vecteurs en vue de travaux phytogénétiques. L'ADNt de plasmides Ti a été désarmé par remplacement des fonctions d'oncogénèse (ou des oncogènes) par d'autres fragments d'ADN (Zambryski et collab., 1983). Cette opération permet la régénération de plantes ou de tissus transgéniques normaux sur le plan phénotypique. Le tableau 4 énumère des plasmides Ti désarmés, et les figures 5 et 6 donnent les résultats du procédé de neutralisation. Aucun plasmide Ri désarmé n'est disponible.

Le premier type de plasmide Ti désarmé a été fabriqué par échange des oncogènes avec les séquences pBR322 par des techniques de recombinaison génique homologue (Van Haute et collab., 1983; Zambrysky et collab., 1983). Les deux frontières d'ADNt ont été conservées sur ce vecteur et l'ADN à transférer à la plante a été introduit entre ces frontières par recombinaison homologue avec des séquences pBR322. Les gènes ont été clonés et manipulés dans des organismes *E. coli*, transférés par conjugaison avec *A. tumefaciens*. À cette fin, des vecteurs intermédiaires possédant un réplicon à spectre d'activité étroit ont été utilisés parce qu'ils ne pouvaient pas se répliquer de manière autonome chez *A. tumefaciens*. En vue du maintien, il faut une co-intégration avec le plasmide Ti ainsi qu'une pression de sélection sur le plasmide intermédiaire pour la résistance aux antibiotiques afin d'assurer la stabilité de l'intégration.

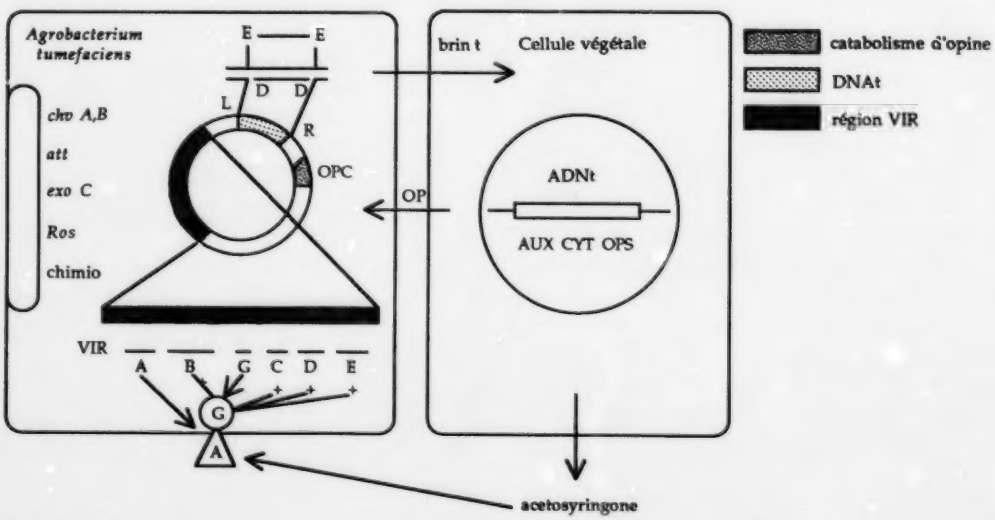


Figure 4. Schéma des réactions moléculaires qui participent au transfert de l'ADNt. Les gènes chromosomiques qui participent à la transformation génétique sont *chvA,B*, *att*, *exoC*, *ros* et chimio. Les gènes VIR sont A, B, G, C, D et E, et ils sont induits par des composés chimiques, comme l'acétosyringone, par l'intermédiaire du chimiorécepteur (produits géniques de VIR A), qui, à son tour, active les produits géniques du VIR G. À leur tour, ces derniers activent les autres gènes VIR. Les produits géniques du VIR D participent au traitement de l'ADNt (G = frontière gauche, D = frontière droite), et les produits géniques du VIR E participent au transfert. Les produits géniques du VIR B font partie d'un complexe transmembranaire de transfert de l'ADNt linéaire. Une fois que l'ADNt est intégré dans le génome de la plante, les gènes de synthèse d'hormones (*aux*, *cyt*) ainsi que les gènes de l'opine-synthase (*ops*) sont exprimés dans la cellule végétale.

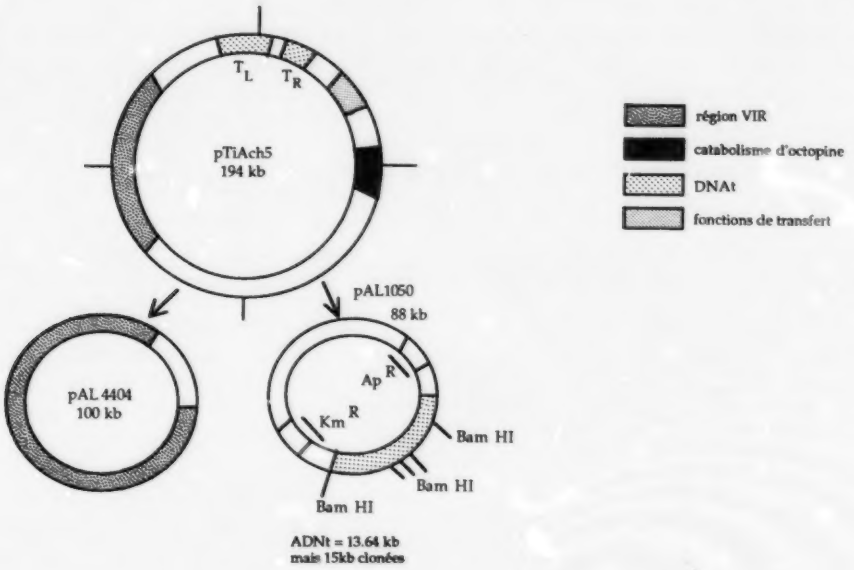


Figure 5. Dérivation du plasmide Ti désarmé pAL4404 et de son ADNt pAL1050. Le plasmide pTiAch5 de l'octopine a été modifié par mutation au moyen de transposons, et un mutant de délétion sans ADNt (pAL4404) a été obtenu (Ooms et collab., 1982). Le vecteur pAL4404 ne peut être utilisé que comme plasmide auxiliaire de vecteurs binaires avec leur propre ADNt. L'ADNtG du pAL1050 a été obtenu par clonage dans un vecteur intermédiaire, ce qui a donné un vecteur binaire (Hoekema et collab., 1983). Abrévations : kb = kilobases, Km = kanamycine, Ap = ampicilline, *R* = résistant, et Tra = transfert.

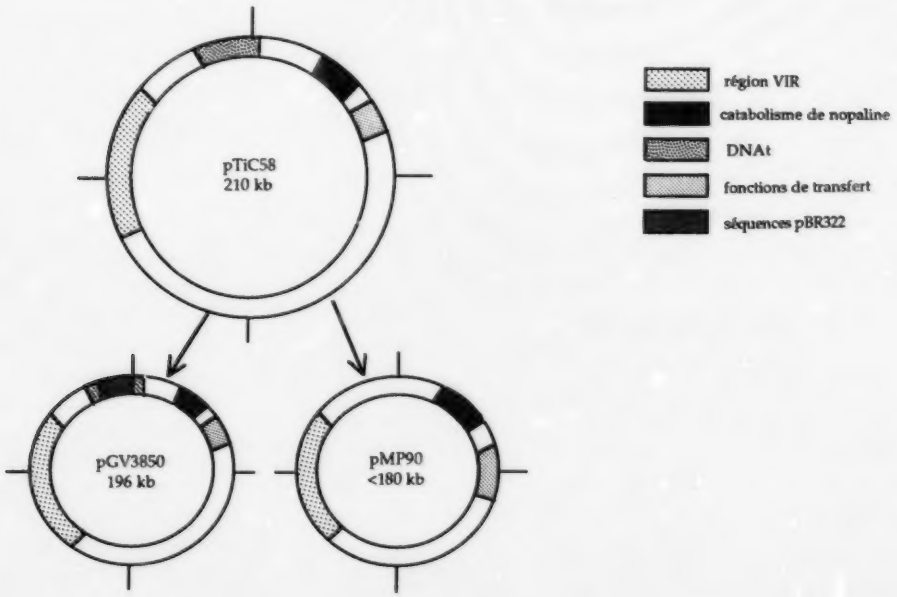


Figure 6. Dérivation des plasmides Ti désarmés pGV3850 et pMP90. Le plasmide Ti C58 de la nopaline a été désarmé par une double recombinaison avec le pBR322 (dans le cas du pGV3850; Zambryski et collab., 1983), et avec le pTiD37 (dans le cas du pMP90; Koncz et Schell, 1986). Le plasmide pGV3850 peut se prêter à la cointégration dans ses séquences pBR322, maintenant devenues des séquences d'ADNt, ou avec un vecteur binaire comme plasmide auxiliaire. Le plasmide pMP90 ne peut servir que de plasmide auxiliaire aux vecteurs binaires avec leur propre ADNt. Abréviations : kb = kilobases, Tra = fonctions de transfert.

Dans la plupart des cas, il faut un troisième plasmide pour mobiliser le plasmide intermédiaire d'*E. coli* à *Agrobacterium*. Ce plasmide, appelé un plasmide auxiliaire, est normalement présent dans une seconde souche d'*E. coli*. La conjugaison à trois conjugants est assurée par le mélange de deux souches d'*E. coli* et de la souche d'*Agrobacterium*; on pratique une sélection pour récupérer les souches où s'est produite la co-intégration du vecteur plasmide intermédiaire avec le vecteur plasmide Ti (Van Haute et collab., 1983).

Un deuxième type de plasmide Ti désarmé a été fabriqué sans les frontières d'ADNt (Hoekema et collab., 1983; Hood et collab., 1986; Koncz et Schell, 1986). Il peut seulement être utilisé in trans vers un autre vecteur qui contient les frontières d'ADNt. On a incorporé dans ces plasmides un réplicon à spectre d'activité étalé, qui permet leur réplication autonome chez *Agrobacterium*. Les frontières d'ADNt permettent le traitement par des fonctions VIR transportées in trans par des plasmides Ti ou des plasmides Ri désarmés ou du type sauvage. On appelle ce type de plasmide un vecteur binaire parce que deux plasmides différents sont nécessaires chez *Agrobacterium* pour un transfert d'ADNt (Hoekema et collab., 1983; Bevan, 1984). Le vecteur binaire est manipulé chez *E. coli* et transféré à *Agrobacterium* par conjugaison, de la façon décrite antérieurement. La pression de sélection pour la résistance aux antibiotiques est également nécessaire au maintien du plasmide dans *Agrobacterium* (Van Haute et collab., 1983; Bevan, 1984). La figure 7 montre le processus de conjugaison à trois conjugants.

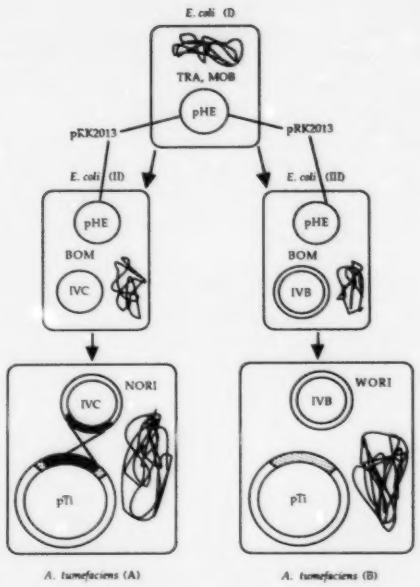


Figure 7. Conjugaison triparentale entre *E. coli* et *A. tumefaciens*. Les vecteurs binaires (IVB) sur *E. coli* III ou cointégrés (IVC) sur *E. coli* (*E. coli* II) sont mobilisés, avec l'aide d'un plasmide auxiliaire (pHE) dans une autre souche de *E. coli* (*E. coli* I) qui possède les gènes de transfert (TRA) et de mobilisation (MOB). Les produits géniques agissent *in trans* sur l'origine bactérienne des sites de mobilisation (MOB) des vecteurs intermédiaires. Ils sont transférés à *A. tumefaciens*. Le vecteur intermédiaire du type à cointégration a une origine de réplication à spectre d'activité étroit (NORI), et il doit être intégré dans le plasmide Ti pour être maintenu de façon stable (*A. tumefaciens* A). Le vecteur intermédiaire du vecteur binaire a une origine de réplication à spectre d'activité étalé (WORI), et il peut être maintenu de manière autonome chez *A. tumefaciens* (B).

3.4 Récupération des plantes transgéniques

On a récupéré des plantes transgéniques au moyen du transfert direct et indirect des gènes, comme décrit précédemment. Afin d'obtenir un bilan de cette technologie, une liste des espèces végétales qui ont été produits par génie génétique a été dressée à partir des publications (tableau 5). Cette liste met en relief les graves contraintes qui prennent origine dans les systèmes de culture de tissus et qui s'exercent sur le développement des techniques de production des plantes transgéniques.

3.4.1 Espèces végétales génétiquement transformées

On a obtenu des plantes transgéniques de 46 espèces, notamment chez les dicotylédones, les monocotylédones et les arbres (tableau 6). Environ le cinquième de ces espèces (11) appartient à la famille des Solanacées. Chez les Crucifères, des *B. napus* transgéniques ont fait l'objet de nombreux rapports qui portaient sur la transformation. La plupart des travaux portant sur d'autres familles que ces deux-là se ramènent à des rapports uniques; ce qui indique que l'application des techniques de transformation se trouve encore à un stade préliminaire. Il s'est révélé être extrêmement difficile d'accomplir des travaux en génie génétique chez des monocotylédones par suite de l'inexistence de systèmes de culture de tissus régénérables et de la résistance à la transformation par *Agrobacterium*. La transformation des monocotylédones a fait l'objet de nombreuses recherches partout dans le monde, mais à ce jour, ces efforts ont procuré peu de succès.

Tableau 5. Espèces végétales qui ont produit des plantes transgéniques

Espèces	Nom vernaculaire	Méthode	Marqueur	Références
DICOTYLÉDONES				
Solanacées				
Lycopersicon esculentum	Tomate	*A. tumefaciens*	NPT II	McCormick et collab. (1986) Bino et collab. (1987)
		A. rhizogenes	NPT II	Shahin et collab. (1986b)
Lycopersicon peruvianum		*A. rhizogenes*	R.C.	Morgan et collab. (1987)
Nicotiana clevelandii		*A. tumefaciens*	NPT II	Tavazza et collab. (1988)
Nicotiana edwardsonii		*A. tumefaciens*	NPT II	Kiernan et collab. (1989)
Nicotiana glauca		*A. rhizogenes*	NPT II	Morgan et collab. (1987)
Nicotiana plumbaginifolia		*A. tumefaciens*	Bleo	Hill et collab. (1986)
		A. tumefaciens	NPT II	Trinh et collab. (1987)
Nictotiana sylvestris		*A. tumefaciens*	NPT II	Neuhaus et collab. (1991)
Nicotiana tabacum	Tabac	*A. tumefaciens*	NPT II	Horsch et collab. (1985)
		A. tumefaciens	SPT	Jones et collab. (1987)
		A. tumefaciens	HPT	Waldron et collab. (1985)
		A. tumefaciens	CAT	De Block et collab. (1985)
		Électroporation	NPT II	Paszkowski et collab. (1984)
Petunia hybrida	Saint-Joseph (petunia)	*A. tumefaciens*	NPT II	Wallroth et collab. (1986), Meyer et collab. (1987)
		A. tumefaciens		Sanders et collab. (1987)
		A. tumefaciens	DHFR	Eichholtz et collab. (1987)
Salanum melongena	Aubergine	*A. tumefaciens*	NPT II	Guri et Sink (1988), Filipone et Lurquin (1989)
Solanum nigrum	Morelle noire	*A. rhizoenes*	R.C.	Wei et collab. (1986)
Solanum tuberosum	Pomme de terre	*A. tumefaciens*	NPT II	Shahin et Simpson (1986), Ooms et collab. (1987), Eckes et collab. (1986)
			R.C.	Hanisch et collab. (1988)
Légumineuses				
Glycine canescens	Soya sauvage	*A. rhizogenes*	R.C.	Rech et collab. (1988)
Glycine max	Soya	*A. tumefaciens*	NPT II	Hinchee et collab. (1988)
		Microprojection	NPT II	McCabe et collab. (1988)
Lotus corniculatus	Trèfle	*A. rhizogenes*	R.C., CAT	Stougaard-Jensen et collab. (1986) Webb et collab. (1990)
Medicago sativa	Luzerne	*A. tumefaciens*	NPT II	Shahin et collab. (1986a)
Medicago varia	Luzerne	*A. tumefaciens*	NPT II	Deak et collab. (1986)
Pisum sativum	Pois	*A. tumefaciens*	HPT	Puonti-Kaerlas et collab. (1990)
Stylosanthes spp.	Stylo Townsville	*A. tumefaciens*	NPT II	Manners (1988)
Trifolium repens	Trèfle blanc	*A. tumefaciens*	NPT II	White et Greenwood (1987)
Crucifères				
Arabidopsis thaliana		*A. tumefaciens*	HPT	Lloyd et collab. (1986)
		A. tumefaciens	NPT II	Feldmann et Marks (1987)
Brassica juncea	Moutarde	*A. tumefaciens*	NPT II	Mathews et collab. (1990b)
Brassica napus	Colza	*A. tumefaciens*	NPT II	Charest et collab. (1988)
		A. tumefaciens	CAT	
		A. tumefaciens	DHFR	Pua et collab. (1987)
		A. tumefaciens	NPT II	Fry et collab. (1987)
		Électroporation	NPT II	Guerche et collab. (1987b)
		Micro-injection	NPT II	Neuhaus et collab. (1987)
		A. rhizogenes	R.C.	Guerche et collab. (1987c)
Brassica oleracea	Chou-fleur	*A. rhizogenes*	R.C.	David et Tempe (1988)
Linum usitatissinum	Lin	*A. tumefaciens*	NPT II	Basiran et collab. (1987), Jordan et McHughen (1988)
Autres dicotylédones				
Apium graveolens	Céleri	*A. tumefaciens*	NPT II	Catlin et collab. (1988)
Armoracia lapathifolia	Raifort	*A. rhizogenes*	R.C.	Noda et collab. (1987)
Atropa belladona	Belladone	*A. tumefaciens*	NPT II	Mathews et collab. (1990a)
Beta vulgaris	Betterave sucrière	*A. tumefaciens*	NPT II CAT GUS	Lindsay et Gallois (1990)
Catharanthus roseus		*A. rhizogenes*	R.C.	Brillanceau et collab. (1989)
Convolvulus arvensis	Liseron	*A. rhizogenes*	R.C.	Slightom et collab. (1985)
Cucumis melo	Melon brodé	*A. tumefaciens*	NPT II	Fang et Grumet (1990)

Tableau 5 (suite)

Espèces	Nom vernaculaire	Méthode	Marqueur	Références
Cucumis sativus	Concombre	*A. rhizogenes*	NPT II	Trulson et collab. (1986)
		A tumefaciens	NPT II	Chee (1990)
Daucus carota	Carotte	*A. rhizogenes*	R.C.	David et collab. (1984)
Fragaria x ananassa	Fraise	*A. tumefaciens*	NPT II	Nehra et collab. (1990)
Gossypium hirsutum	Coton	*A. tumefaciens*	NPT II, CAT	Firoozabady et collab. (1987), Umbeck et collab. (1987)
Helianthus annuus	Tournesol	*A. tumefaciens*	NPT II	Everett et collab. (1987)
Kalanchoë laciniata		*A. tumefaciens*	NPT II	Jia et collab. (1989)
Lactusa sativa	Laitue	*A. tumefaciens*	NPT II	Michelmore et collab. (1987)
		Électroporation	NPT II	Chupeau et collab. (1989)
Ribes nigrum	Gadellier noir	*A. tumefaciens*	NPT II, GUS	Graham et McNicol (1991)
MONOCOTYLÉDONES				
Asparagus officinalis	Asperge	*A. tumefaciens*	NPT II	Bytebier et collab. (1987)
Dactylis glomerata	Dactyle pelotonné	Électroporation	HPT	Horn et collab. (1988)
Oryza sativa	Riz	Électroporation	NPT II	Toriyama et collab. (1988), Shimamoto et collab. (1989)
Secale cereale	Seigle	Macro-injection	NPT II	De La Pena et collab. (1987)
Zea mays	Maïs	Électroporation	NPT II	Rhodes et collab. (1988)
Zea mays	Maïs	Microprojection	PAT	Gordon-Kamm et collab. (1990)
ARBRES (Dicotylédones)				
Allocasuarina verticillata		*A. rhizogenes*	R.C.	Phelep et collab. (1991)
Azadirachta indica	Margousier	*A. tumefaciens*	NPT II	Naina et collab. (1989)
Citrus jambhiri		Introduction P.E.G.	NPT II	Vardi et collab. (1990)
Juglans regia	Noyer	*A. tumefaciens*	NPT II	McGranaham et collab. (1988)
Malus pumila	Pommier	*A. tumefaciens*	NPT II	James et collab. (1989)
Populus alba x grandidenta	Peuplier	*A. tumefaciens*	NPT II EPSP	Fillatti et collab. (1987b)
Vitis rupestris	Vigne	*A. tumefaciens*	NPT II GUS	Mullins et collab. (1990)

Note : Cette liste énumère toutes les espèces qui ont produit des plantes transgéniques dont il a été question dans la documentation scientifique. Chez les espèces où es plantes transgéniques normales ont été obtenues, les plantes transgéniques obtenues par l'intermédiaire d'*A. rhizogenes* ont été omises. Abréviations : NPT II = néomycine phosphotransférase II, R.C. = racines chevelues, Bléo = résistance à la bléomycine, SPT = spectinomycine phosdihydrofolate réductase, EPSP = 5-énolpuryvylshikimate-3-phosphate synthase, et PAT = phosphinotricine acétyltransférase, GUS = β-glucoronidase.

La transformation assurée par *Agrobacterium* a été la méthode la plus développée de génie phytogénétique appliquée aux dicotylédones. Le gène de la néomycine phosphotransférase II (NPT II) s'est révélé être un marqueur très utile de récupération de tissus transgéniques chez les monocotylédones, les dicotylédones et les espèces forestières. Chez les monocotylédones, des méthodes autres que le transfert de gènes par *Agrobacterium* ont été appliquées avec un certain succès.

Tableau 6. Nombre total d'espèces qui ont produit des plants et des callus transformés

	Plantes transgéniques récupérées	
	Phénotype normal	Phénotype racines chevelues
Dicotylédones		
Solanacées	9	3
Légumineuses	7	1
Crucifères	4	1
Autres	12	5
Arbres (dicotylédones)	8	1
Monocotylédones	5	
Total	45	11

3.4.2 Marqueurs de transformation génétique et construction de gènes

On peut appliquer deux grandes stratégies de récupération de plantes transgéniques après des transformations de protoplastes, de cellules, de tissus ou d'explants. Dans un cas, on procède à une présélection de toutes les plantes régénérées qui proviennent d'une expérience de transformation, afin de détecter l'expression d'un gène qu'on peut trier (ou d'un gène rapporteur). La deuxième stratégie est la sélection de protoplastes, cellules, tissus ou explants transformés en fonction de leur résistance à un agent sélectif, qui est conférée par un marqueur génétique qu'on peut choisir. Les deux types de gènes marqueurs sont des échafaudages chimériques qui contiennent tous les signaux nécessaires à l'expression dans la plante, mais qui ne sont pas nécessairement d'origine végétale (voir au paragraphe suivant pour une analyse de la construction des gènes). Le tableau 7 donne une liste des gènes marqueurs

Tableau 7. Gènes marqueurs utilisés en génie phytogénétique

Marqueur criblable	Source	Substrat	Référence
nopaline synthase	plasmide Ti	^{14}C-arginine	Holbrook et collab. (1986)
octopine synthase	plasmide Ti	^{14}C-arginine	Holbrook et collab. (1986)
chloramphénicol acétyltransférase	Tn9	^{14}C-chloramphénicol	De Block et collab. (1984)
néomycine phosphotransférase	Tn5	γ-^{32}P-ATP	Herrera-Estrella et collab. (1983)
luciférase	*Photenus pyralis*	luciférine	Ow et collab. (1986)
luciférase	*Vibrio harveyi*	décanal	Koncz et collab. (1987)
β-glucuronidase	*E. coli*	X-glu, MUG, PNPG	Jefferson etal. (1987)
β-galactosidase	*E. coli*	X-gal, ONPG	Helmer et collab. (1984)

Marqueur sélectionnable	Source	Résistance	Référence
chloramphénicol acétyltransférase	Tn9	chloramphénicol	De Block et collab. (1984)
néomycine phosphotransférase I	Tn601	kanamycine	Fraley et collab. (1983)
néomycine phosphotransférase II	Tn5	kanamycine, généticine, paramomycine	Fraley et collab. (1983), Herrera-Estrella et collab. (1983), Guerche et collab. (1987b)
hygromycine phosphotransférase	*E. coli*	hygromycine	Waldron et collab. (1985)
dihydrofolate réductase	pR67	méthotréxate	Herrera-Estrelle et collab. (1983)
	Souris	méthotréxate	Eichholtz et collab. (1987)
streptomycine phosphotransférase	Tn5	streptomycine	Jones et collab. (1987)
résistance à la bléomycine	Tn5	bléomycine, phléomycine	Hille et collab. (1986) Perez et collab. (1989)
gentamicine acétyltransférase	pLG62	gentamicine, kanamycine	Hayford et collab. (1988)
résistance à la bléomycine	*Streptoalloteichus hindustanus*	bléomycine	Perez et collab. (1989)
résistance à la phléomycine	*Streptoalloteichus hindustanus*	phléomycine	Perez et collab. (1989)
dihydroptéroate synthase	pR46	Sulfonamides	Guerineau et collab. (1990)

Abréviations : X-glu = 5-bromo-4-chloro-3-indolylglucuronide, MUG = 4-méthylumbelliférylglucuronide, PNPG = p-nitrophénolglucuronide, X-gal = 5-bromo-4-chloro-3-indolylgalactoside, et ONPG = 0-nitrophényl-b-D-galactopyranoside.

utilisés dans les expériences de génie phytogénétique, ainsi que leur origine.

Les marqueurs génétiques rapporteurs donnent un produit génique ou bien ils ont une activité enzymatique facilement détectables. Des méthodes de criblage très sensibles du gène de la synthase de la nopaline (Holbrook et collab., 1986), du gène de la chloramphénicol acétyltransférase (De Block et collab., 1984), du gène de la ß-glucuronidase (Jefferson et collab., 1987) ainsi que des gènes de la luciférase (Ow et collab., 1986; Koncz et collab., 1987) ont été mises au point. Tous ces gènes peuvent être détectés au moyen de l'activité enzymatique qu'ils codent. Les gènes de la ß-glucuronidase et de la luciférase peuvent être observés *in situ* au moyen de leurs produits définitifs (Ow et collab., 1986; Jefferson et collab., 1987; Koncz et collab., 1987). L'expression des gènes de la ß-galactosidase et de la luciférase peut être détectée par incubation des tissus végétaux transformés avec leurs substrats respectifs sans destruction des tissus testés (Helmer et collab., 1984; Ow et collab., 1986; Koncz et collab., 1987).

Les marqueurs géniques sélectionnables sont utilisés pour faire la distinction entre des cellules transformées et des cellules non transformées. En général, ces marqueurs sont des gènes qui détoxiquent un antibiotique ou un antimétabolite ajouté dans le milieu de culture. La dihydrofolate réductase, une forme mutante d'une enzyme semblable présente dans les plantes résistantes au médicament méthotréxate (Eichholtz et collab., 1987), est une exception à cette règle. L'avantage apporté par la sélection est la réduction de la quantité de matériel non transformé à manipuler. Dans certains systèmes de culture de tissus végétaux, à très faible fréquence de transformants, l'agent de sélection est un outil inefficace de récupération des cellules transformées parce que celles-ci peuvent être sensibles aux métabolites mis en circulation par les cellules environnantes non transformées et en dégénérescence. Le gène de la néomycine phototransférase II a constitué le marqueur sélectionnable le plus utilisé parce qu'on considère qu'il est un gène marqueur sélectionnable presque idéal. Le tableau 8 donne les caractéristiques d'un tel marqueur idéal; ces caractéristiques sont comparées à celles du NPT II. Les gènes de la résistance aux herbicides ont aussi servi de marqueurs sélectionnables. Il en est question en 4.4.

Afin que soient exprimés ces gènes marqueurs chez des plantes, les régions codantes ont été fusionnées aux séquences de promotion, d'activation et de terminaison. Un schéma d'un gène d'une plante est présenté à la figure 8. Ces séquences sont souvent extraites des gènes du plasmide Ti de la synthase de la nopaline (Bevan et collab., 1983; Depicker et collab., 1983), de la synthase de l'octopine (De Greve et collab., 1983), de la synthase de la mannopine (Di Rita et Gelvin, 1987) ainsi que de ceux des produits de transcription des gènes 19S et 35S du virus de la mosaïque du chou-fleur (Odell et collab., 1985; Lawton et collab., 1987). On croyait que les séquences de promotion et d'activation de ces gènes permettaient l'expression constitutive des gènes chimériques dans les tissus végétaux transgéniques (Koziel et collab., 1984; Shaw et collab., 1984; Odell et collab., 1985; An, 1986; Di Rita et Gelvin, 1987). Cependant, une spécificité tissulaire ou cellulaire a été rapportée dans le cas du promoteur 35S (Nagata et collab., 1987). Ce dernier est à l'origine d'un niveau de transcription, chez *N. tabacum* transgénique, supérieur à ce qu'il est avec le promoteur de la synthase de la nopaline (Sanders et collab., 1987; Harpster et collab., 1988).

3.5 Confirmation d'une transformation génétique stable

La confirmation de l'intégration stable des gènes dans le génome d'un végétal constitue une étape importante de la régénération des plantes transgéniques. L'idéal serait que ce phénomène soit confirmé par la constitution de preuves phénotypiques et physiques de la présence des gènes introduits dans la plante transgénique originale ainsi que dans la descendance.

Tableau 8. Caractéristiques d'un marqueur sélectionnable idéal en vue de la transformation d'organismes végétaux, à comparer aux caractéristiques du gène de la néomycine phosphotransférase II (NPT II) (entre parenthèses)

1.	L'agent sélectif (antibiotique) doit opérer une sélection sévère. (Le NPT II est relativement sélectif lorsqu'il est utilisé avec la kanamycine; cependant, il y a des rapports à l'effet qu'il serait partiellement fonctionnel.)
2.	L'agent de sélection ne doit pas interférer avec la régénération de plantes transgéniques. (La kanamycine n'interfère pas, mais elle ralentit la régénération dans plusieurs cas.)
3.	Le marqueur sélecionnable devrait permettre l'utilisation de différents agents de sélection. (Le NPT II permet l'utilisation de la kanamycine, de la néomycine, de la paromomycine et de la généticine.)
4.	Le mécanisme de sélection doit opérer sur un grand nombre d'espèces végétales. (Le NPT II constitue le marqueur sélectionnable le plus usité; voir au tableau 5.)
5.	Le gène marqueur sélectionnable decrait être disponible dans différents échafaudages géniques. (Le NPT II a servi à des échafaudages avec un nombre important de vecteurs différents et de séquences régulatrices.)
6.	L'activité du produit du gène marqueur sélectionnable doit pouvoir être décelée. (Le NPT II peut être décelé au moyen d'un essai sur gélose ou d'un essai par transfert sur membrane.)
7.	L'agent de sélection doit être peu coûteux et facilement disponible. (La kanamycine, la néomycine et la généticine sont toutes peu coûteuses et disponibles auprès des sociétés qui vendent des produits chimiques.)

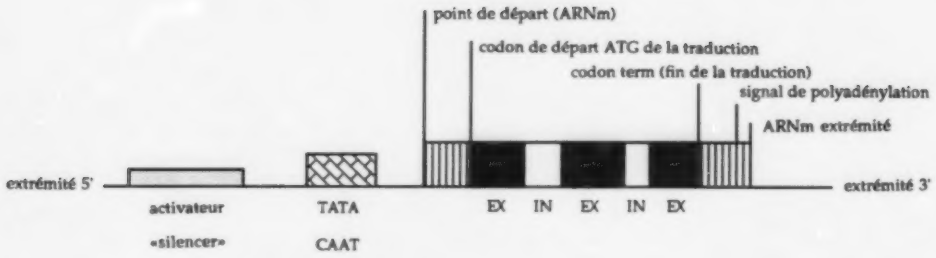


Figure 8. Schéma d'un gène d'origine végétale. Un gène typique d'origine végétale comporte trois régions : la région du promoteur-régulateur, qui comprend des éléments activateurs ou des éléments «silencers» responsables de la régulation de l'expression du gène, ainsi que les boîtes TATA et CAAT qui sont à l'origine du traitement du gène. La région codante comprend l'amorce de l'ARNm, le codon de départ ATG de la traduction, les exons (des séquences d'ADN qui seront traduites en protéines), ainsi que les introns (des séquences d'ADN qui seront éliminées de l'ARNm). Le terminateur à l'extrémité 3' assure la terminaison appropriée de la séquence génique lorsque celle-ci est traduite et transcrite. Le site d'addition poly A correspond à l'endroit où la poly A polymérase ajoute une queue poly A à l'ARNm.

Il y a lieu d'assurer un contrôle adéquat afin d'empêcher toute forme d'interférence par des contaminants ou des micro-organismes endogènes. Les gènes introduits, lors d'un transfert de Southern, devraient se trouver avec l'ADN à poids moléculaire élevé et, le cas échéant, il faudrait pouvoir montrer le réarrangement des séquences intégrées. L'activité génique devrait être détectable par des moyens enzymatiques ou phénotypiques. Dans le tableau 5, certaines des références mentionnées, où il est question d'espèces transgéniques (en particulier des monocotylédones) ne possèdent pas tous les éléments requis pour confirmer que la transformation est stable. Pour une revue critique, le lecteur est prié de consulter Potrykus (1990) qui a procédé à l'évaluation des méthodes de transfert de gènes chez des céréales.

On doit rendre compte de ces critères afin que l'on puisse confirmer la transformation génétique stable; cependant, avec certains systèmes végétaux, il n'est pas facile de les obtenir dans tous les cas (voir en 5.3).

3.6 Effets physiologiques de l'introduction de gènes étrangers

À ce jour, on n'a rapporté aucun effet prononcé de gènes marqueurs (qui peuvent être criblés ou sélectionnés) sur la physiologie d'ensemble de plantes transgéniques. Bien que des changements morphologiques aient été observés chez des régénérants, il n'est pas certain que ces changements soient attribuables au mécanisme de la régénération ou à l'intégration du gène lui-même.

4. GÉNIE PHYTOGÉNÉTIQUE AVEC DES GÈNES D'UTILITÉ AGRONOMIQUE

Les manipulations génétiques de plantes avec des gènes d'utilité agronomique ont été limitées à des caractères génétiques uniques. La résistance à des maladies virales, à des insectes, à des herbicides ainsi qu'à des métaux lourds a été conférée à des systèmes végétaux modèles comme *N. tabacum*, *P. hybrida*, *L. esculentum* et *A. thaliana*. On a tenté de conférer la résistance à des mycoses, mais les résultats n'ont pas été concluants. Il est maintenant possible de procéder à des manipulations génétiques en vue de conférer une résistance à des bactérioses ainsi que la régulation de la croissance. Cette partie de notre revue du domaine portera sur les réalisations obtenues en génie phytogénétique avec des caractères culturaux.

4.1 Résistance à des viroses

La résistance à des viroses de plantes transgéniques a été obtenue à l'aide de trois processus différents (tableau 9). Le premier mécanisme copie le phénomène de la protection croisée virale, c'est-à-dire l'infection d'une plante avec un avirulent ou une souche bénigne d'un virus qui empêche l'apparition de symptômes graves lorsque la même plante est infectée par une souche pernicieuse du même virus (Fulton, 1986). Ce résultat a été obtenu sur des plantes transgéniques par clonage du gène ADNc de la protéine de l'enveloppe virale et par son intégration dans le génome de la plante. Le tableau 9 énumère les plantes transgéniques à qui on a con-

Tableau 9. Protection virale chez des plantes transgéniques

Mécanisme	Virus	Plante	Référence
ARN satellite	Virus de la mosaïque du concombre (VMC)	*N. tabacum*	Baulcombe et collab. (1986), Harrison et collab. (1987)
Protéine de l'enveloppe		*N. tabacum*	Cuozzo et collab. (1988)
Gène anti-sens contre le gène protéine enveloppe		*N. tabacum*	
Protéine de l'enveloppe	Virus de la mosaïque du tabac (VMT)	*L. esculentum*	Nelson et collab. (1988)
Protéine de l'enveloppe	Virus de la mosaïque de la tomate (ToMV)	*N. tabacum*	Powell-Abell et collab. (1986)
Protéine de l'enveloppe	Virus de la mosaïque de la luzerne	*N. tabacum*	Loesch-Fries et collab. (1987)
Protéine de l'enveloppe	(AIMV)	*N. tabacum* *L. esculentum*	Tumer et collab. (1987)
Gène anti-sens contre le gène de la protéine de l'enveloppe Anti-sens	Virus X de la pomme de terre (VXP)	*N. tabacum*	Hemenway et collab. (1988)
ARN satellite	Virus des taches annulaires du tabac (TobRV)	*N. tabacum*	Gerlach et collab. (1987)
Protéine de l'enveloppe du virus de la mosaïque du soya	Virus de la gravure du tabac (VGT)	*N. tabacum*	Stark et Beachy (1989)
Protéine de l'enveloppe	Virus de la bigarrure du tabac (TSV)	*N. tabacum*	Van Dun et Bol (1988)
Protéine de l'enveloppe	Virus du rattle du tabac (TRV)	*N. tabacum*	Van Dun et collab. (1988)
Gène anti-sens contre le gène protéine enveloppe		*N. tabacum*	Powell et collab. (1989)
Protéine de l'enveloppe	Virus X de la pomme de terre	*S. tuberosum*	Lawson et collab. (1990)

féré une résistance à des viroses; il y aurait lieu de consulter une revue complète de la question par Beachy et al. (1990) sur la résistance aux protéines de l'enveloppe qui est conférée. Chaque fois que cette méthode a été appliquée, on a observé, chez les plantes transgéniques, un retard de la propagation du virus dans l'ensemble de l'organisme et une diminution du nombre de lésions ainsi que du nombre de plantes qui présentaient les symptômes de l'infection. La résistance induite pourrait être attribuable au blocage de l'assimilation initiale des virions par la cellule ou au blocage du détachement de l'enveloppe une fois que le virion a pénétré dans la cellule (Tumer et collab., 1987; Cuozzo et collab., 1988; Hemenway et collab., 1988). Il a également été avancé que la protéine de l'enveloppe pourrait inhiber la transcription de l'ARN viral (Loesch-Fries et collab., 1987) ainsi que la propagation du virus d'une cellule à l'autre (Cuozzo et collab., 1988). Ce genre de protection peut être en partie défait par l'utilisation d'un inoculum d'ARN au lieu de virions (Tumer et col-

lab., 1987). Dans le cas de la protection contre le virus X (PVX) de la pomme de terre, l'inoculum d'ARN n'a pas surmonté la protection comme il avait été observé avec d'autres virus (Hemenway et collab., 1988). On croit que la protéine de l'enveloppe du PVX ou son ARN exerce un effet inhibiteur lors des premières étapes d'infection par l'ARN. Des essais sur le terrain, qui portaient sur des plants transgéniques de *L. esculentum* qui exprimaient un gène codant pour la protéine de l'enveloppe du virus de la mosaïque du tabac (TMV), ont montré que la résistance au TMV et au ToMV (virus de la mosaïque de la tomate) peut être obtenue (Nelson et collab., 1988).

L'introduction d'un gène anti-sens contre le gène de la protéine de l'enveloppe virale, constitue le second mécanisme de protection appliqué aux plantes transgéniques. L'ARN anti-sens pourrait s'hybrider soit avec la protéine de l'enveloppe du virus infectieux, soit avec son ARN, empêchant ainsi la réplication. Cette méthode a été appliquée à *N. tabacum* contre le virus de la mosaïque du concombre (CMV) (Cuozzo et collab., 1988), contre le PVX (Hemenway et collab., 1988), ainsi que contre le virus du rattle du tabac (TRV) (Powell et collab., 1989). Cependant, la résistance obtenue n'est fonctionnelle qu'à un faible niveau d'inoculum seulement.

La troisième stratégie est fondée sur l'introduction d'un gène qui code pour l'ARN satellite viral présent dans les phytovirus à ARN, et qui supprime les symptômes d'infection virale. L'ARN satellite cloné qui exprime son ADN avec le CMV (Harrison et collab., 1987) et le virus de la tache annulaire du tabac (TobRV) (Gerlach et collab., 1987) chez *N. tabacum* a conduit à une atténuation de l'intensité des symptômes. L'interaction de l'ARN satellite avec l'ARN viral est une explication possible de ce type de tolérance. Cette méthodologie comporte d'importantes limites parce que les ARN satellites ne sont trouvés que chez certains virus à ARN; ainsi, la résistance est spécifique à des hôtes et spécifique à des virus.

4.2 Résistance aux insectes

La résistance aux insectes dans les plantes transgéniques a été obtenue à l'aide de deux types différents de gènes. Dans les deux cas, la transformation assurée par l'intermédiaire d'*A. tumefaciens* a servi à l'obtention de plantes transgéniques. Le premier type comprend des gènes qui codent pour des toxines d'insecte, qui sont produites par *Bacillus thuringiensis*. Lors de la sporulation bactérienne, ces toxines sont produites sous forme d'inclusions protéiniques cristallines. Elles sont dissoutes en conditions alcalines dans l'intestin moyen des insectes (Aronson et collab., 1986) et sont coupées en peptides qui sont toxiques seulement pour les insectes. Il existe différentes souches de *B. thuringiensis*; chacune est active contre des insectes déterminés. La souche israelensis agit contre les *Diptera*, les souches *kurstaki* et *berliner agissent* contre les *Lepidoptera* et les souches *tenebrionis* et *san diego* agissent contre les *Coleoptera* (Aronson et collab., 1986).

Un gène tronqué de la synthèse de toxine de *B. thuringiensis* var. *berliner* a servi à la production de *N. tabacum* transgénique résistant aux larves de *Manduca sexta* (sphinx du tabac) (Vaeck et collab., 1987). Il a été nécessaire de recourir à un gène tronqué pour obtenir des protéines de la toxine en concentration biologiquement significative. Le degré de résistance dépendait du niveau d'expression génétique. Des résultats semblables ont été obtenus avec le gène de la toxine de *B. thuringiensis* var. *kurstaki* chez des plantes transgéniques de *N. tabacum* (Barton et collab., 1987), qui était résistant au sphinx du tabac. En outre, la mortalité chez ces insectes s'est accrue et les dégâts causés aux plantes par d'autres insectes ont diminué (noctuelle verdoyante, *Heliothis virescens*; ver de l'épi de maïs, *Heliothis zea*; légionnaire de la betterave, *Spodoptera exigua*). Le même gène sous une forme tronquée, utilisé chez *L. esculentum* transgénique, a réduit les dommages provoqués par les larves du sphinx du tabac (Fischhoff et collab., 1987; Delannay et collab., 1989). Les plants transgéniques de *L. esculentum* étaient aussi résistants à *H. virescens* et à *H. zea*.

L'autre classe de gènes modifiés code pour les inhibiteurs de la protéinase trouvés dans les feuilles de différentes plantes. Ces gènes, qui codent pour des protéines obtenues de manière naturelle et induites par l'attaque d'insectes, inhibent de l'action des enzymes digestives des insectes et aussi d'autres animaux. Par rapport aux insectes ou autres animaux contre lesquels ils ont un effet, ces gènes sont non spécifiques, mais ils sont spécifiques à certaines classes d'enzymes digestives (tableau 10; pour une revue de ces inhibiteurs, voir Garcia-Olmedo et collab., 1987). Les gènes inhibiteurs de la protéinase ont été isolés chez la tomate, la pomme de terre et le dolique (Hilder et collab., 1987; Ryan et An, 1988).

Tableau 10. Inhibiteurs protéiques des protéinases

Groupe d'inhibiteurs	Enzymes inhibées
Inhibiteurs de la trypsine du soya	Sérine protéinases et a-amylases endogènes
Inhibiteurs Bowman Birk	Sérine protéinases
Inhibiteurs de la trypsine des céréales	Sérine protéinases et a-amylases hétérologues
Inhitibeurs I et II de la pomme de terre	Sérine protéinases
Inhibiteurs de la couge	Sérine protéinases
Inhibiteurs de la cathepsine D et de la pepsine	
Inhibiteurs de la trypsine du dolique	Inhibiteurs de la sérine

Des plants de *N. tabacum* transgéniques qui expriment un gène inhibiteur de la trypsine chez le dolique, ont été obtenus par transformation par l'intermédiaire d'*A. tumefaciens* (Hilder et collab., 1987). Les plants transgéniques étaient tolérants à la noctuelle verdoyante (*Heliothis virescens*). L'avantage de cette technique est le potentiel de résistance à bon nombre d'insectes (*Heliothis*, *Spodoptera*, *Diabrotica* et *Tribolium*), contrairement aux méthodes fondées sur les gènes de la toxine de *Bacillus thuringiensis*, dont la résistance s'applique à moins d'espèces.

4.3 Résistance aux métaux lourds

Certains sols ont été contaminés par des métaux lourds tels que le Cd, l'Hg, le Zn et le Cu à la suite d'une pollution industrielle et agricole (Davis, 1984; Poon, 1984). Les cultures maraîchères et fourragères qui isolent les métaux lourds dans certains de leurs tissus qui ne sont pas consommés par l'homme ou par les animaux peuvent nous offrir une protection. Les plantes ont leurs propres protéines de fixation du Cd (phytochélatines) (Grill et collab., 1985); or, par génie génétique, il est possible d'accroître la quantité de protéines qui lient les métaux dans des plantes transgéniques.

Maiti et collab. (1988) ont transféré à *N. tabacum* un gène hybride murin de la synthèse de métallothionéine, fixatrice de métaux lourds, par transformation à l'aide d'*A. tumefaciens*. Cependant, il n'y a pas eu d'épreuve pour mesurer la fixation de métaux par ce gène transgénique. Lors d'une autre étude, le gène de la métallothionéine II d'un hamster a été inséré dans le virus de la mosaïque du chou-fleur (CaMV) qui a servi de vecteur pour l'infection de plantes de *B. campestris* (Lefebvre et collab., 1987). Les plantes infectées par le virus ont manifesté une tolérance au Cd et on y observait l'épuisement des pools de Cd dans les tissus foliaires. Une tolérance accrue au Cd a été obtenue chez des *B. napus* et *N. tabacum* transgéniques modifiés par un gène hybride humain de la synthèse de la métallothionéine (MT-II; Misra et Gedamu, 1989). Ces résultats montrent qu'il est possible de conférer aux plantes une tolérance aux métaux lourds par transformation génétique. Prises ensemble, ces études montrent qu'une métallothionéine animale peut fonctionner chez des plantes transgéniques.

4.4 Résistance aux herbicides

La résistance des plantes aux herbicides prend une importance commerciale particulière. Chez des plantes transgéniques, cette résistance peut être obtenue par le moyen de trois stratégies différentes : l'introduction d'un gène mutant qui code pour une enzyme porteuse d'un site modifié de fixation d'herbicide, l'introduction d'un gène hybride qui est à l'origine d'une surproduction de l'enzyme cible de l'herbicide, et l'introduction d'un gène qui code pour une enzyme de détoxification de l'herbicide (tableau 11). Toutes les trois méthodes ont été exploitées.

On a obtenu du succès avec la stratégie fondée sur l'utilisation de gènes mutants de résistance aux herbicides qui se sont montrés efficaces contre les herbicides glyphosate (Monsanto) et chlorsulfuron (DuPont). Le glyphosate (N-(phosphonométhyl) glycine est un herbicide à spectre d'action étalé dont l'activité est dirigée contre l'enzyme 5-énolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase (EPSP synthase), qui participe à la synthèse d'acides aminés aromatiques (Steinrucken et Amrhein, 1980). Lorsque l'herbicide est actif, le shikimate n'est pas métabolisé et il s'accumule; cela conduit à un épuisement des acides aminés aromatiques. On a isolé un gène mutant, chez la bactérie *Salmonella typhimurium*, qui donne une substitution de la proline pour la sérine dans l'enzyme, ce qui atténue l'affinité de l'herbicide pour cette dernière (Comai et collab., 1985). Ce gène a été fusionné à des séquences promotrices de l'octopine synthase et de la mannopine synthase; ensuite, il a été introduit chez *N. tabacum* et *L. esculentum* afin de conférer la tolérance à l'herbicide glyphosate. Les plantes transgéniques sont résistantes à l'herbicide, mais le rendement est diminué de 30 à 70 % (Comai et collab., 1985; Fillatti et collab., 1987b). On a obtenu des résul-

Tableau 11. Génie génétique conférant la résistance aux herbicides à des plantes

Herbicide	Plante	Mécanisme	Gène	Référence
Chlorsulfuron	*N. tabacum*	Mutation	acétolactate synthase	Haughn et collab. (1988), Lee et collab. (1988), Gabard et collab. (1989) Charest et collab. (1990)
	L. esculentum	Mutation	acétolactate synthase	Mazur et collab. (1987a,b)
	M. sativa			D'Halluin et collab. (1990)
	B. napus			Miki et collab. (1990)
Glyphosate	*N. tabacum*	Mutation	aroA	Comai et collab. (1985)
	*B. campestris**	Mutation	aroA	Thompson et collab. (1987b)
	L. esculentum	Mutation	aroA	Fillatti et collab. (1987a)
	P. hybrida	Surexpression	EPSP synthase	Shah et collab. (1986)
	A. thaliana	Surexpression	EPSP synthase	Klee et collab. (1987b)
Phosphinotricine	*L. esculentum*	Détoxification	Phosphinotricine, acétyltransférase	De Block et collab. (1987)
		Surexpression	glutamine synthétase	Eckes et collab. (1989)
Bromoxynil	*N. tabacum*	Détoxification	Nitrilase	Stalker et collab. (1988)
2,4-D	*N. tabacum*	Détoxification	2,4-D monooxygénase	Streber et Willmitzer (1989)
	N. tabacum	Détoxification	2,4-D monooxygénase	Lyon et collab. (1989)
Atrazine	*N. tabacum*	Mutation	psbA	Cheung et collab. (1988)

tats semblables en appliquant la même méthode à des tissus tumoraux de *B. campestris* transformée (Thompson et collab., 1987b).

Un gène qui code pour une acétolactate synthase (*csrl-1*) résistante au chlorsulfuron et qui a été isolé dans la lignée mutante GH50 d'*A. thaliana* a servi à la récupération de plants transgéniques de *N. tabacum* (Haughn et collab., 1988; Gabard et collab., 1989; Charest et collab., 1990). Ce gène confère aussi une résistance contre les sulfonylurées. Les deux herbicides appartiennent aux sulfonylurées, une nouvelle classe d'herbicides qui inhibent l'acétolactate synthase (ALS), une enzyme essentielle dans la voie de la biosynthèse d'acides aminés ramifiés (Ray, 1986). L'enzyme ALS, bien qu'elle soit codée par un gène nucléaire, se trouve située dans le chloroplaste, soit le site de la biosynthèse des acides aminés (Mazur et collab., 1987a,b). On a obtenu des résultats semblables avec deux gènes mutants de *N. tabacum* (C3 du locus *SuRA* et Hra-S4 du locus *SuRB*). Les *N. tabacum* et *L. esculentum* transgéniques sont résistants au chlorsulfuron et au sulfométuron méthyl à concentration élevée (Mazur et collab., 1987a,b; Lee et collab., 1988).

La deuxième stratégie pour procurer une résistance à des plants transgéniques résistants aux herbicides passe par la surexpression de l'enzyme cible. Cette stratégie a servi à conférer une résistance à l'herbicide glyphosate. Le gène de l'EPSP synthase, isolé dans une lignée cellulaire surproductrice de *P. hybrida*, a été fusionné avec le promoteur 35S du CaMV, et réintroduit dans *P. hybrida*. Les plants transgéniques pouvaient résister à plus de quatre fois la dose de glyphosate normalement requise pour tuer les plantes (Shah et collab., 1986). Une stratégie semblable a été appliquée au gène de l'EPSP synthase d'*A. thaliana*, isolé avec le gène de l'EPSP synthase de *P. hybrida* comme sonde. Le gène de l'EPSP synthase d'*A. thaliana* a été fusionné avec des séquences promotrices du 35S, puis il a été réintroduit dans *A. thaliana*. Les plantes transgéniques étaient résistantes au glyphosate *in vitro* (Klee et collab., 1987b).

Chez les plantes, le gène de l'EPSP est un gène codé dans le noyau, synthétisé comme précurseur cytoplasmique et dont l'enzyme est dirigée sur le chloroplaste (Della-Cioppa et collab., 1987). Cela pourrait expliquer pourquoi Comai et al. (1985) ont observé uniquement une tolérance, plutôt

qu'une résistance complète, au glyphosate avec le gène bactérien *AroA*. On pourrait définir ici la tolérance comme étant la survie de plantes, mais avec un retard de croissance, alors que la résistance est définie en termes d'absence totale de symptômes de toxicité. L'utilisation de gènes provenant de végétaux et de séquences peptidiques double brin transitoires (Shah et collab., 1986; Klee et collab., 1987) a pu assurer le transport jusqu'au chloroplaste, tandis que l'enzyme codée par *AroA* n'avait pas de séquence de transition et qu'elle a pu être confinée dans le cytoplasme. La surexpression de l'enzyme cible a aussi servi à conférer la résistance à la L-phosphino-tricine dans des plantes transgéniques de *N. tabacum* (Eckes et collab., 1989). Un gène de la glutamine synthétase de la luzerne (*Medicago sativa*) a été attaché au promoteur 35S d'un CaMV afin d'assurer la surexpression de cette enzyme et de conférer la tolérance à l'herbicide (Eckes et collab., 1989). Les plantes transgéniques étaient résistantes à l'herbicide en concentration environ quatre fois supérieure à celle qui est appliquée sur le terrain.

La troisième stratégie est fondée sur l'utilisation d'un gène de synthèse d'une enzyme détoxifiante chez des plantes transgéniques afin d'assurer la résistance à des herbicides. Cette méthode a été appliquée à des plantes transgéniques de *N. tabacum*, de *L. esculentum* et de *S. tuberosum* afin de leur conférer une résistance à la phosphinotricine et au bialaphos (De Block et collab., 1987). Ce dernier est un antibiotique produit par *Streptomyces hygroscopicus* (Imai et collab., 1985); il est presque identique à la phosphinotricine, sauf qu'il comporte deux résidus d'alanine. La phosphinotricine est synthétisée par voie chimique, et elle est un analogue de l'acide glutamique (Bayer et collab., 1972). Ces deux herbicides sont des inhibiteurs de l'enzyme glutamine synthétase qui joue un rôle important dans l'assimilation de l'ammoniac et la régulation du métabolisme de l'azote chez les plantes (Tachibana et collab., 1986). Lorsque l'enzyme est inhibée par un de ces deux herbicides, l'ammoniac s'accumule et détruit les cellules végétales. Le gène de la détoxification a été isolé chez *S. hygroscopicus* (Thompson et collab., 1987a). Ce gène (bar) code pour une enzyme phosphinotricine acétyltransférase à l'origine de l'acétylation du groupement NH_2 libre de la phosphinotricine et du bialaphos, ce qui les neutralise. Le gène bar a été fusionné avec des séquences de promotion 35S et introduit dans des plantes de *N. tabacum*, *L. esculentum* et *S. tuberosum* afin de leur conférer la résistance à la phosphinotricine (Basta) et au bialaphos (Herbiacea) jusqu'à la dose d'application de 20 L/ha; ce qui est de trois à huit fois la dose appliquée sur le terrain (De Block, et collab., 1987).

D'autres chercheurs ont entrepris des travaux semblables, au moyen d'un mécanisme de détoxification chez le *N. tabacum* transgénique pour conférer une résistance au bromoxynil (3,5-dibromo-4-hydroxybenzonitrile; Stalker et collab., 1988) et au 2,4-D (acide(4-chloro-2-méthylphénoxy)acétique; Lyon et collab., 1989; Streber et Willmitzer, 1989). Dans le cas de la résistance au bromoxynil, un gène (*bxn*) codant pour une nitrilase, qui convertit le bromoxynil en dérivés chimiques inactifs, a été isolé chez la bactérie terricole *Klebsiella ozaenae* et raccroché à un promoteur réglé par l'éclairement (RuBP) en vue de la transformation génétique de *N. tabacum*. La descendance des plantes transgéniques était résistante à l'herbicide en concentration appliquée sur le terrain (0,57 kg/ha). Enfin, avec l'herbicide 2,4-D, la résistance a été conférée à des plantes transgéniques par utilisation d'un gène de détoxification (*tfdA*; 2,4-dichlorophénoxyacétate monooxygénase (DPAM); Lyon et collab., 1989; Streber et Willmitzer, 1989) qui provient de la bactérie terricole *Alcaligenes eutrophus* combinée à un promoteur chez les plantes (35S). Les plantes transgéniques de *N. tabacum* étaient résistantes au 2,4-D en doses appliquées sur le terrain (1-2 kg/ha).

4.5 Résistance à des mycoses

On a tenté de conférer une résistance aux mycoses en utilisant des gènes de la chitinase isolés chez *Serratia marcescens* (Jones et collab., 1986) lors des expériences de transformation par l'intermédiaire d'*A. tumefaciens*. On s'attendait à conférer cette résistance parce que la chitinase hydrolyse la chitine de différents agents phytopathogènes comme *Fusarium oxysporum* (Jones et collab., 1986). Jones et al. (1985) ont obtenu des plantes transgéniques de *P. hybrida* et Jones et al. (1988) en ont obtenu de *N. tabacum*; cependant, la résistance aux mycoses n'a pas été évaluée. Une tentative semblable a été faite avec un gène de la chitinase provenant de *N. tabacum*, sous le contrôle du promoteur 35S qui a été introduit chez *N. sylvestris* (Neuhaus et collab., 1991). Les plantes transgéniques ont été éprouvées par le champignon pathogène *Cercospora nicotiana*; aucun accroissement de la résistance n'a été constaté.

4.6 Résistance à des bactérioses

En génie phytogénétique appliqué, il existe un potentiel d'utilisation de gènes d'insectes qui codent pour des protéines antibactériennes. Les insectes possèdent un système d'immunité humorale qui est induit par une infection bactérienne. Certaines familles de peptides antibactériens ont été caractérisées jusqu'au niveau du gène; on pense aux lysozymes, aux cécropines et aux attacines de la Saturnie cécropia (*Hyalophora cecropia*) ainsi qu'aux apidécines des abeilles domestiques (*Apis mellifera*) (Jaynes et collab., 1987; Casteels et collab., 1989). Ces peptides serviront très bientôt à des travaux de génie génétique pratiqués sur des plantes vivrières afin de les rendre résistantes aux bactérioses.

Avec une autre méthode appliquée à *N. tabacum* et couronnée de succès, on introduisait un gène bactérien (*ttr* : resistance tabtoxine, soit la toxine de la tache bactérienne) qui code pour une enzyme qui acétyle la toxine de *Pseudomonas syringae* pv. tabaci. Cette toxine participe à la maladie dite feu bactérien et elle provoque l'apparition de symptômes de chlorose. L'expression du gène *ttr* chez les plantes transgéniques a conféré une résistance à la toxine de la tache bactérienne (Anzai et collab., 1989, 1990; Anzai et Yoneyama, 1990); c'est une démonstration de la possibilité de conférer aux plantes, par génie génétique, une résistance aux bactérioses.

4.7 Régulateurs de croissance

Des gènes régulateurs de croissance ont été isolés des plasmides Ti et Ri d'*Agrobacterium*. Ils codent pour des gènes qui participent à la synthèse biologique d'auxines et de cytokinines (section 3.3.1.a). Le gène de synthèse de l'isopentènyl transférase, du plasmide Ti d'*A. tumefaciens*, qui code pour une enzyme qui participe à la biosynthèse des cytokinines, a été utilisé en combinaison avec un promoteur par choc thermique afin de modifier le développement de plantes transgéniques de *N. tabacum* et d'*A. thaliana* (Medford et collab., 1989). Les plantes obtenues avaient une hauteur, une superficie foliaire et un diamètre de la tige réduits.

Deux gènes qui codent pour des enzymes productrices de l'auxine acide indol-acétique, ont été introduits dans *P. hybrida* par transformation par l'intermédiaire d'*A. tumefaciens* (Klee et collab., 1987a). Il a été observé que les plantes transgéniques, qui avaient des gènes placés sous le contrôle d'un promoteur constitutif, présentaient une morphologie anormale. Ces plantes avaient des feuilles de petite taille et enroulées ainsi que des racines adventives. Il n'y avait pas de ramification, ce qui est indicatif d'une dominance apicale prononcée; en outre, les tiges étaient allongées et ligneuses. Ce phénomène signifie que le génie génétique peut être appliqué à la modification de la forme et de l'apparence d'ensemble d'une plante. Des phénomènes semblables ont été observés lors de transformations génétiques de type sauvage avec le plasmide Ri : les plantes transgéniques avaient des entrenoeuds courts, des feuilles froissées, des racines plagiotropes et une fertilité réduite (Guerche et collab., 1987c). L'utilisation d'un plasmide Ti modifié permet de contourner les problèmes extrêmes d'une fertilité réduite et du développement de racines plagiotropes.

La technique des gènes anti-sens a permis l'inhibition de la synthèse de l'hormone éthylène chez des plantes transgéniques de *L. esculentum* (Hamilton et collab., 1990). Ce résultat a été obtenu par introduction d'un gène anti-sens hybride pour concurrencer un gène inconnu qui code pour une protéine. On a trouvé que cette protéine était en corrélation avec la production d'éthylène chez *L. esculentum*. L'expression du gène anti-sens a conduit à une réduction du degré de production d'éthylène. On a pris comme hypothèse que le gène inconnu participait à la conversion de l'acide 1-aminocyclopropane-1-carboxylique en éthylène. Cela évoque la possibilité de la régulation de la production de cette hormone qui prend part à l'abscission, à la sénescence ainsi qu'à la maturation des fruits.

4.8 Qualité des fruits et des légumes

Des plantes transgéniques de *L. esculentum* ont été produites grâce à un gène anti-sens de la synthèse de polygalacturonase (Smith et collab., 1988; Kramer et collab., 1989) qui réduisait l'expression du gène endogène dans le fruit du plant de tomate. Le produit génique obtenu est important pour le ramollissement du fruit par solubilisation de la fraction pectinique de la paroi cellulaire. Dans une étude complémentaire (Smith et collab., 1990), l'inhibition de la dépolymérisation de la pectine, l'accumulation de lycopène, la solubilisation de la polyuronide, l'activité de l'invertase et l'activité de la pectinestérase ont été

établies; cependant, il n'y a pas eu d'effet sur la production d'éthylène.

Le génie génétique peut également être appliqué à l'amélioration de la qualité nutritive des plantes comestibles. Chez *Solanum tuberosum*, un gène hybride synthétique de 292 paires de bases qui code pour un acide aminé essentiel, et fusionné à une structure d'un promoteur NOS et d'un gène CAT, a été introduit par transformation par l'intermédiaire d'*Agrobacterium*, et il s'est exprimé dans toutes les parties des plantes transgéniques de pomme de terre. (Yang et collab., 1989). On a constaté qu'entre 0,02 et 0,35 % des protéines totales étaient des protéines de fusion. Cependant, aucun renseignement relatif à l'amélioration de la qualité des protéines n'a été fourni. Au cours d'une expérience semblable, un gène de synthèse d'une protéine séminale, riche en méthionine, provenant de la noix du Brésil (*Bertholletia excelsa*), a été transféré à *N. tabacum* et a été exprimé dans la semence (Altenbach et collab., 1989). Des résultats semblables ont été obtenus avec des plantes transgéniques de *B. napus* (Guerche et collab., 1990). On a mesuré une augmentation de 30 % de la teneur en méthionine dans des semences transgéniques de *N. tabacum*. Cela évoque la possibilité d'une amélioration ou d'une modification de la qualité nutritive des protéines séminales.

En outre, la sucrosité des légumes et des fruits pourrait être modifiée. Le gène qui code pour la protéine sucrée thaumatine a servi, au cours d'expériences de transformation, à la production de plantes transgéniques de *S. tuberosum*. Le gène a été exprimé dans les feuilles et pouvait être détecté par l'intense goût sucré des tissus transgéniques (Witty, 1989). On voit deux applications probables : 1) une amélioration de la sucrosité des aliments; et 2) la dérivation d'un nouveau marqueur des tissus transformés qu'on peut cribler.

4.9 Modification de la couleur des fleurs

On est parvenu à modifier la couleur des fleurs de *Petunia hybrida* par transfert du gène de la dihydroquercétine 4-réductase de *Zea mays* à des mutants de *P. hybrida* dépourvus de pigmentation (Meyer et collab., 1987; Mol et collab., 1989). On a obtenu, de la sorte, une nouvelle pigmentation rouge attribuable à l'expression constitutive, avec un promoteur 35S du CaMV, du gène chez des plantes transgéniques; celui-ci produit une enzyme du cycle des flavoprotéines. Une autre méthode a été utilisée, soit l'utilisation d'un gène constitué d'ARN anti-sens amené à jouer contre un gène de la chalcone synthase chez des plantes transgéniques de *P. hybrida*. On a observé une inhibition à différents degrés de la pigmentation des fleurs (Van DerKrol et collab., 1990).

4.10 Production de composés chimiques à action biologique

Un peptide à activité biologique a été obtenu par génie génétique chez *B. napus* et *A. thaliana* par transformation par l'intermédaire d'*Agrobacterium tumefaciens* (Venderkerckhove et collab., 1989). Ce résultat a été obtenu par l'utilisation du gène spécifique à la semence qui code pour l'albumine 2S chez *A. thaliana*, et par l'introduction dans sa région codante du gène pentapeptidique qui code pour l'encéphaline (un neuropeptide à activité d'opiacée), avec des sites de coupure tryptique à chaque extrémité du neuropeptide. Le gène hybride a été exprimé spécifiquement dans la semence et le peptide a été isolé par extraction protéinique et coupure enzymatique. Les plantes transgéniques des deux espèces ont produit jusqu'à 200 nmol de peptide par gramme de semences.

On a pu obtenir des anticorps fonctionnels dans des plantes transgéniques de tabac par transfert de gènes hybrides qui codaient pour des chaînes de gamma et de kappa-immunoglobuline d'hybridomes murins. Les anticorps ont été produits jusqu'à raison de 1,3 % des protéines totales des feuilles (Hiatt et collab., 1989). Cela ouvre la voie à la production, dans des plantes, d'anticorps qui se fixeraient à des molécules précises, comme des herbicides ou des contaminants du milieu.

4.11 Stérilité florale

Avec la caractérisation de gènes spécifiques à des tissus ou à des stades, de nouvelles possibilités de recherche s'ouvrent en génie phytogénétique. L'obtention de la stérilité mâle sur des plantes transgéniques constitue un excellent exemple d'une application fondamentale (Peacock, 1990). Un gène spécifique à un tissu, qui n'est exprimé que dans le tapetum des anthères, a été caractérisé et son promoteur utilisé en combinaison avec deux gènes de synthèse de RNAse pour produire des gènes hybrides «suicidaires» qui tuent les cellules des assises nourricières lorsqu'ils sont exprimés (Mariani et collab., 1990). La stérilité mâle a été obtenue chez des

plantes transgéniques de *N. tabacum* ainsi que de *B. napus* grâce à l'application de cette méthode. Les techniques de ce type vont se révéler extrêmement utiles dans les programmes d'amélioration génétique appliquée.

5. APPLICATION DU GÉNIE GÉNÉTIQUE AUX ESPÈCES FORESTIÈRES

5.1 Transformation génétique chez les arbres

On peut considérer qu'il y a deux classes de réalisations en matière de transformation génétique des arbres. La première porte sur les angiospermes, en particulier toutes les dicotylédones. Avec ce groupe, on peut prendre comme hypothèse que les grands principes de régulation et d'expression génétique sont ceux qui s'appliquent aux plantes vivrières. La seconde classe comprend les gymnospermes (conifères uniquement). Celles-ci sont des espèces plus primitives que les précédentes et il reste encore beaucoup de choses à expliquer relativement à la régulation et à l'expression des gènes chez elles. Des études antérieures (Smith 1935a,b, 1936, 1937, 1938, 1939, 1942; De Cleene et De Ley, 1976) ont fait état de la tumeur du collet chez des espèces forestières, mais on n'avait pas compris alors que ces tumeurs résultaient de transformations génétiques.

Des plantes transgéniques ont été obtenues des angiospermes suivants : *Juglans regia* (noyer), *Malus pumila* (pommier), hybrides de *Populus alba* x *grandidenta* (peuplier), de *P. trichocarpa* x *deltoides* ainsi que de *P. alba* x *tremula* (peuplier faux-tremble), au moyen d'*A. tumefaciens* dans tous les cas (tableau 12.) On fait état d'une récupération possible de plantes transgéniques chez *Azadirachta indica* (margousier) et chez *Citrus jambhiri*, mais il n'y a pas de preuve définitive (voir en 3.5). *A. tumefaciens* a été appliquée à la production de tissus transformés (tumeurs) chez un certain nombre d'autres espèces (tableau 12). La technique d'électroporation a été appliquée à *Alnus incana*, mais cela n'a conduit qu'à une expression transitoire.

Aucune plante transgénique n'a été obtenue des gymnospermes (tableau 13). *A. rhizogenes* et *A. tumefaciens* ont été utilisés à la production de tumeurs chez des descendants au stade de plantules qui appartenaient à différentes espèces, et l'électroporation a été appliquée à l'obtention d'une expression transitoire dans les protoplastes de *Picea glauca* (épinette blanche), de *Picea mariana* (épinette noire), de *Pinus banksiana* (pin gris), de *Pinus taeda* (pin à encens), de *Pseudotsuga menziesii* (Douglas taxifolié) ainsi que de *Larix* x *eurolepis* (mélèze hybride); cependant, aucune transformation stable n'a été obtenue (tableau 13). On notera avec intérêt que des opines ont été détectées dans des tissus tumoraux; cela indique que ces gènes, et leurs promoteurs, sont fonctionnels chez les gymnospermes (Sederoff et collab., 1986; Dendekar et collab., 1987; Diner et Karnosky, 1987; Ellis et collab., 1989; Loopstra et collab., 1990). De manière semblable, le promoteur du 35S du CaMV, accroché au gène Lux, a été exprimé dans des tumeurs de Pseudotsuga menziesii (Ellis et collab., 1989). Ces résultats témoignent de la possibilité d'appliquer des gènes hybrides qui sont conçus pour des plantes vivrières, à la transformation génétique de gymnospermes.

La recherche axée sur la récupération de plantes transgéniques d'espèces forestières est récente, comme on peut le constater en consultant les références indiquées aux tableaux 12 et 13 (essentiellement des articles de 1988 et 1989). Quoique la récupération de plantes transgéniques se soit révélée impossible chez les gymnospermes d'espèces forestières, le développement de l'embryogénèse somatique et des sytèmes de protoplastes chez les conifères permettra de récupérer des plantes transgéniques. La transformation génétique est possible via *Agrobacterium*, qui est un facteur important de la réussite de la récupération de plantes transgéniques. D'autres méthodes devraient être étudiées afin que différents types de tissus puissent être utilisés selon les différents procédés de transformation (par exemple la micro injection et la microprojection).

5.2 Problèmes associés au génie génétique chez les espèces forestières

Bien qu'on ait accumulé une somme considérable de connaissances relatives au génie génétique et à la biologie moléculaire des plantes vivrières, la majeure partie de ces connaissances ne peut être appliquée directement à des espèces forestières. Les arbres ont des cycles biologiques longs et complexes, ce qui rend difficile l'évaluation de la transmission transgénique à la descendance. Des techniques telles que l'induction florale accélérée pourraient contribuer à atténuer cette difficulté. Le travail avec les gymnospermes se trouve compliqué du fait de leur important génome (environ 10^9 - 10^{10} paires de bases), ce qui

Tableau 12. Transformation génétique d'espèces forestières appartenant aux angiospermes*

Espèeces	Nom vernaculaire	Méthode	Résultats	Références
Allocasuarina verticillata		*A. rhizogenes*	Arbres transgéniques (régénérants de racines chevelues)	Phelep et collab. (1991)
Alnus glutinosa	Aulne	*A. tumefaciens*	Tumeurs dans les plantules *in vitro*	Mackay et collab. (1988)
Alnus incana	Aulne	*A. tumefaciens*	Tumeurs dans les plantules *in vitro*	Mackay et collab. (1988)
Alnus incana	Aulne	Électroporation	Expression transitoire (GUS)	Séguin et Lalonde (1988)
Azadirachta indica	Margousier	*A. tumefaciens*	Plantules résistants à km	Naina et collab. (1989)
Betula papyrifera	Bouleau	*A. tumefaciens*	Tumeurs sur plantules *in vitro*	Mackay et collab. (1988)
Carica papaya	Papaya	*A. tumefaciens*	Tissus transgéniques résistants à km	Pang et Sanford (1988)
Citrus jambhiri	Rough lemon	P.E.G. Introduction	Plants transgéniques résistants à km	Vardi et collab. (1990)
Citrus sinensis	Orange	P.E.G. Introduction	Callus résistants à km	Kobayashi et Uchimiya (1989)
Citrus sinensis	Orange	*A. tumefaciens*	Callus transgéniques et plantules transgéniques possibles résistants à km et Hyg	Hidaka et collab. (1990)
Juglans regia	Noyer	*A. tumefaciens*	Plants transgéniques résistants à km	McGranahan et collab. (1988)
Malus pumila	Pommier	*A. tumefaciens*	Expression transitoire (GUS)	Martin et collab. (1990)
Malus pumila	Pommier	*A. tumefaciens*	Plants transgéniques résistants à km	James et collab. (1989)
Populus trichocarpa x *deltoides*	Peuplier	*A. tumefaciens*	Tumeurs *in vitro*	Parsons et collab. (1986)
		A. rhizogenes	Racines et plantules résistantes à km	Phytoud et collab. (1987)
Populus alba x *grandidenta*	Peuplier	*A. tumefaciens*	Plants transgéniques résistants à km	Fillatti et collab. (1987b)
			Tumeurs *in vitro* résistants à km	Chun et collab. (1988)
Populus alba x *tremula*	P. faux-tremble	*A. tumefaciens*	Plants transgéniques résistants à km et PPT	De Block (1990)
Populus trichocarpa x *deltoides*	Peuplier	*A. tumefaciens*	Plants transgéniques résistants à km et PPT	De Block (1990)
Prunus persica	Pêcher	*A. tumefaciens*	Tumeurs *in vitro*	Hammerschlag et collab. (1989)
Prunus persica	Pêcher	*A. tumefaciens* *A. rhizogenes*	Expression transitoire (GUS)	Martin et collab. (1990)
Prunus persica	Pêcher	*A. tumefaciens*	Callus résistants à km, G418	Scorza et collab. (1990)
Robinia pseudoacacia	Faux-acacia	*A. tumefaciens* *A. rhizogenes*	Tumeurs sur segments hypocotyle *in vitro* Tumeurs résistants à km	Davis et Keathley (1989)
Salix schaverinii	Saule	*A. tumefaciens*	Tumeur *in vitro* et chez des plants	Vahala et collab. (1989)
Salix viminalis	Saule (osier blanc)			
Salix dasyclados				Mullins et collab. (1990)
Vitis rupestris	Vigne	*A. tumefaciens*	Plants transgéniques (GUS+NPT II)	
Vitis vinifera	Vigne vinifère		Bourgeons transformés (GUS+NPT II)	

*Toutes les espèces énumérées sont des dicotylédones. Abréviations : km = kanamycine, Hyg = hygromycine, GUS = β-glucuronidase, NPT II = néomycine phosphotransférase, PPT = phosphinotricine.

Tableau 13. Transformation génétique d'espèces appartenant aux gymnospermes*

Espèces	Nom vernaculaire	Méthode	Résultats	Références
Abies nordmanniana	Sapin de Nordmann	*A. tumefaciens*	Tumeus sutr plantules	Clapham et Ekberg (1986)
Abies procera	Sapin noble	*A. tumefaciens* *A. rhizogenes*	Tumeurs sur plantules	Morris et collab. (1989)
Larix decidua	Méièze d'Europe	*A. rhizogenes*	Racines sur tige cultivée *in vitro*	Diner et Karnosky (1987), Karnosky et collab. (1988)
Larix eurolepis	Mélèze hybride	*Électroporation*	Expression transitoire de GUS et CAT	Charest et collab. (1991)
Libocedrus decurrens	Cèdre à encens	*A. tumefaciens*	Tumeurs sur plantes	Stomp et collab. (1990)
Picea abies	Épinette de Norvège	*A. tumefaciens*	Tumeurs sur plantules	Clapham et Ekberg (1986), Clapham et collab. (1990), Hood et collab. (1990)
Picea glauca	Épinette blanche (Épicea blanc)	Électroporation	Expression transitoire de CAT et GUS	Wilson et collab. (1989), Bekkaoui et collab. (1988)
		A. tumefaciens	tumeurs sur plantules	Ellis et collab. (1989)
Picea engelmanni	Épinette/Épicea d'Engelmann	*A. tumefaciens*	Tumeurs sur plantules	Ellis et collab. (1989)
Picea mariana	Épinette noire	Électroporation	Expression transitoire de CAT	Tautorus et collab. (1989)
Picea mariana	Épinette noire	Microprojection	Expression transitoire de GUS	Duchesne et Charest (1991)
Picea sitchensis	Épinette de Sitka	*A. tumefaciens*	Tumeurs sur plantules	Ellis et collab. (1989)
Pinus banksiana	Pin gris	Électroporation	Expression transitoire de CAT	Tautorus et collab. (1989)
Pinus eldarica		*A. tumefaciens*	Tumeurs sur plantes	Stomp et collab. (1990)
Pinus elliottii	Pin d'Elliott	*A. tumefaciens*	Tumeurs sur plantes	Stomp et collab. (1990)
Pinus jeffreyi	Pin de Jeffrey	*A. tumefaciens*	Tumeurs sur plantes	Stomp et collab. (1990)
Pinus lambertiana	Pin à sucre	*A. tumefaciens*	Tumeurs sur plantes	Stomp et collab. (1990)
			Callus résistants à km et expression de NPT II	Loopstra et collab. (1990)
Pinus radiata	Pin de Monterey	*A. tumefaciens*	Tumeurs sur plantes	Stomp et collab. (1990)
Pinus sylvestris	Pin sylvestre	*A. tumefaciens*	Tumeurs sur plantes	Stomp et collab. (1990)
Pinus virginiana	Pin de Virginia	*A. tumefaciens*	Tumeurs sur plantes	Stomp et collab. (1990)
Pinus ponderosa	Pin Ponderosa	*A. tumefaciens*	Tumeurs sur plantules	Morris et collab. (1989)
		A. rhizogenes		Stomp et collab. (1990)
Pinus taeda	Pin à encens	*A. tumefaciens*	Tumeurs sur plantules	Sederoff et collab. (1986)
		Électroporation	Expression transitoire de Lux	Stomp et collab. (1990)
				Gupta et collab. (1988)
		Microporjection	Expression transitoire de GUS dans cotylédons	Stomp et collab. (1991)
Pseudotsuga menziesii	Douglas taxifolié	*A. tumefaciens*	Tumeurs sur plantules et expression Lux	Ellis et collab. (1989)
			Tumeurs sur plantules et expression NPT II dans tumeurs	Dandekar et collab. (1987)
		Électroporation	Expression transitoire de Lux	Gupta et collab. (1988)
Tsuga heterophylla	Pruche occidentale	*A. tumefaciens*	Tumeurs sur plantules	Morris et collab. (1989)
		A. rhizogenes	Tumeurs sur plantules	
		A. tumefaciens		Morris et collab. (1989), Morris et Morris (1990)

*Toutes les espèces énumérées sont des conifères. Abréviations : km = kanamycine, Hyg = hygramycine, GUS = β-glucuronidae, CAT = chloramphénicol acétyltransférase, Lux = luciférase, NPTII = néomycine phosphotransférase.

rend ardues la manipulation et la caractérisation des gènes. En outre de ces problèmes «biologiques», le génie génétique appliqué à des espèces forestières soulève des problèmes particuliers au niveau écologique (voir la section 6 pour une analyse détaillée de la question). Puisqu'il s'agit d'espèces vivaces à long cycle biologique, les risques écologiques potentiels qui sont associés aux espèces améliorées sont plus grands que les mêmes risques chez les plantes vivrières.

La régénération d'arbres transgéniques a été réalisée chez des espèces appartenant aux angiospermes (tableau 12). Cependant, les conifères paraissent être réfractaires aux tentatives faites à ce jour. Plusieurs hypothèses peuvent être évoquées :

- Il y a moins de chercheurs qui s'occupent de génie génétique appliqué aux espèces forestières qu'il n'y en a d'intéressés au génie génétique appliqué à des espèces vivrières. Il s'agit du facteur de la masse critique.
- Il y a peu de temps seulement, avec l'arrivée de l'embryogénèse somatique et des progrès en organogénèse, que des systèmes efficaces de cultures tissulaires ont été mis au point.
- On connaît encore mal la structure et la fonction génétique chez les conifères. À ce jour, chez les conifères, il n'y a que dix séquences de gènes qui ont été caractérisées (tableau 14). Seulement des gènes isolés en vue de manipulations génétiques chez les plantes vivrières, ont été utilisés en vue de la transformation génétique de conifères. Les

Tableau 14. Séquences d'ADN caractérisées chez des conifères

Espèces	Séquence	Longueur et type	Référence
Pinus sylvestris	Protéine liaison chlorophylle a/b	2672 pb, ADNc noyau	Jansson et Gustafsson (1990)
Pseudotsuga menziesii	Grande sous-unité de ribulose 1,5-biphosphate carboxylase	1855 pb, ADNg chloroplaste	Hipkins et collab. (1990)
	Séquences répétitives	1266 pb, ADNg chloroplaste	Tsai et Strauss (1989)
Pinus concorta var. *latifolia*	Actine	746 pb, ADNg noyau	Kenny et collab. (1988)
Larix laricina	Petite sous-unité de ribulose 1,5-biphosphate carboxylase	3667 pb, ADNg noyau 2308 pb, ADNc noyau	Hutchison et collab. (1990)
Pinus banksiana	Phénylalanine ammoniac lyase	1400 pb, ADNc noyau	Campbell et collab. (1991)
Pinus radiata	ARNn 5S	524 pb, ADNg noyau	Cullis et collab. (1988)
Pinus concorta	*psb*A	213 pb, ADN g chloroplaste	Lindholm et collab. (1988)
Pinus thunbergii	Petite sous-unité de ribulose 1,5-biophosphate carboxylase protéine liaison chlorophylle a/b	915 pb, ADNc noyau 978 pb, ADNc noyau	Yamamoto et collab. (1988a) Yamamoto et collab. (1988b)
	Grande sous-unité de ribulase 1,5-biophosphate carboxylase	1425 pb, ADNg chloroplaste	Mukai et collab. (1991)
	Total	17 969 pb	

Note : G = génomique; ADNc = ADN complémentaire, pb = paires de bases.

problèmes éprouvés pouvaient être rattachés à des séquences de contrôle précises (chez les conifères) ou à de différents degrés de méthylation des gènes.

- On n'a pas encore trouvé de système efficace d'introduction des gènes dans des conifères. Il est établi qu'*Agrobacterium* peut faire le travail (tableau 13), mais avec une piètre efficacité. De nouvelles méthodes comme la microprojection sont testées, mais sans succès encore.

Cependant, nous sommes confiants qu'avec la participation d'un nombre accru de groupes de recherche et l'introduction de nouvelles connaissances et techniques, on parviendra à régénérer les conifères transgéniques d'ici peu.

5.3 Caractères potentiels à transmettre aux espèces forestières

En s'appuyant sur l'analyse de la section 4, il est facile de déterminer quels caractères offrent du potentiel chez les espèces forestières. Compte tenu de la situation technologique qui prévaut, des caractères seront fort probablement transmis à des angiospermes d'ici peu.

Ceux des angiospermes exploités pour l'agroénergie ou la production de biomasse se trouveraient améliorés par des caractères comme *la résistance aux herbicides* et *aux maladies* (insectes, champignons, virus et bactéries). Étant donné que ces espèces sont exploitées en rotation courte, les problèmes associés à l'évolution de parasites résistants ont une importance moindre. Dans le cas des arbres fruitiers, les caractères associés à la *qualité du fruit* et à la *stérilité florale* pourraient se révéler fort utiles. La *modification de la couleur des fleurs* est une caractéristique qui pourrait être exploitée chez les plantes ornamentales.

En général, il n'est pas souhaitable de conférer une résistance aux parasites, tant chez les angiospermes que les gymnospermes dont le cycle biologique est prolongé, si les gènes introduits sont exprimés constitutivement. Il faudra poursuivre la recherche pour s'assurer que les gènes ne seront exprimés seulement qu'en cas de pullulation grave des parasites. Même dans ce cas, il faut craindre l'apparition de parasites résistants par suite d'une exposition à long terme à des arbres résistants. L'*application de caractères qui dépendent de plusieurs gènes* pourrait réduire cette possibilité.

La stérilité florale offre un potentiel énorme dans le cas des espèces qui vivent longtemps. Ce caractère deviendra probablement nécessaire chez les sujets de plantation afin d'éviter qu'ils soient pollués génétiquement par des espèces sauvages, et l'on ne veut pas non plus que ces derniers eux-mêmes soient pollués par la plantation. Il faudra mettre au point des méthodes pour s'assurer non seulement que le pollen est stérile (voir en 4.11), mais aussi que les organes femelles sont stériles. En outre, la stérilité des arbres conduirait à une importante augmentation du rendement annuel.

Des gènes régulateurs de croissance pourraient servir à modifier la qualité du bois. Il faudra beaucoup de recherche sur l'effet des modifications de l'équilibre hormonal. La *modification de la dominance apicale* est un autre champ potentiel d'application de gènes responsables de la synthèse d'hormones. On pourrait ainsi modifier la forme des espèces ornamentales.

Avec l'accroissement des activités en biologie moléculaire appliquée aux arbres, il est évident que les applications les plus intéressantes résulteront, non du transfert d'une technologie mise au point pour les produits agricoles, mais d'une recherche originale qui est axée sur les espèces forestières. Plusieurs exemples peuvent être cités. Les séquences d'ADN qui codent pour les enzymes phénylalanine ammoniac-lyase et alcool cinnamique déshydrogénase ont été caractérisées chez des conifères; cela ouvre la voie à la modification de la lignine chez ces espèces. Il y a de plus en plus de recherche sur la biosynthèse de la lignine et de la cellulose des espèces forestières. Des gènes ont été isolés (au niveau génomique ou de l'ADNc), ce qui pave le chemin à la manipulation génétique des cycles biochimiques correspondants. Cela a beaucoup d'importance en vue de la modification de la croissance et de la qualité du bois. On pourrait aussi examiner d'autres aspects tels que la *tolérance à la sécheresse*, au *froid* et au *sel*.

L'étude des gènes qui contrôlent la morphogénèse offre un important potentiel de recherche associée aux gymnospermes. Cela pourrait se révéler primordial pour la compréhension des problèmes éprouvés avec la culture de tissus de conifères différenciés et arrivés à maturité. On peut penser au jour où se feront des manipulations de gènes en vue d'*induire une capacité morphogénétique* dans des tissus qui sont par ailleurs réfractaires à la culture tissulaire.

En outre, il y a lieu de souligner l'apparition de nouvelles techniques puissantes de recombinaison de l'ADN comme la PCR (polymerase chain reaction = réaction de chaîne de polymérase)) et les YAC (chromosomes artificiels de levures) ainsi que la mise au point de méthodes ultraperfectionnées de RFLP (polymorphisme des sites de restriction) comme le RAPD (random amplified polymorphic DNA); sans doute ces techniques trouveront-elles des applications autant chez les angiospermes que les gymnospermes. Il est à souhaiter que les généticiens forestiers appliquent ces techniques de pointe à l'obtention d'arbres améliorés et à l'avancement des connaissances en matière de génétique forestière.

6. RÉPERCUSSIONS ÉCOLOGIQUES POSSIBLES DES ESPÈCES FORESTIÈRES GÉNÉTIQUEMENT MODIFIÉES

Les répercussions possibles d'une introduction d'espèces forestières génétiquement modifiées diffèrent considérablement de celles qu'on associe aux plantes vivrières. Les sources d'inquiétude sont notamment le développement d'organismes nuisibles résistants, la perturbation des chaînes écologiques, la généralisation des monocultures par utilisation de matériel cloné, l'apparition de nouvelles espèces nuisibles ainsi que la pollution génétique des espèces naturelles. Les trois premières sources d'inquiétude tiennent à la longueur du cycle biologique des espèces et, par conséquent, se présentent d'une manière beaucoup plus aiguë que les problèmes observés avec les plantes vivrières. Le lecteur est prié de consulter Raffa (1989), Keeler (1989) ainsi que Roberds et collab. (1990) pour un examen détaillé de ces questions. Nous ne reprenons ici que les grandes notions.

L'introduction d'arbres modifiés génétiquement par rapport à leur résistance à des organismes nuisibles donnés, constitue la principale incidence écologique. L'immense pression de sélection qui se trouve être exercée par l'expression constitutive d'un gène unique de résistance se traduirait, sans aucun doute, par l'apparition d'un organisme nuisible résistant. Il serait possible de restreindre ce phénomène au minimum en ayant recours à une expression génique inductible, à des gènes à l'origine d'une multirésistance et faisant appel à différents mécanismes, ainsi qu'en cultivant des arbres non résistants avec des arbres résistants (créer une mosaïque génétique). Toutefois, ces mesures de précaution ne permettraient pas d'éliminer les risques. Les effets «secondaires» de l'introduction d'un gène unique de résistance à des organismes nuisibles pourraient se révéler être pires que l'apparition d'un organisme nuisible-cible qui devient résistant. Les effets qui se répercuteraient dans les chaînes écologiques, l'acquisition d'une résistance par les organismes-cibles à d'autres mécanismes de contrôle ainsi que l'apparition d'organismes nuisibles qui n'avaient pas été pris comme cibles, constituent tous des conséquences potentielles.

L'introduction de nouvelles caractéristiques de croissance dans des sujets transgéniques peut aussi perturber indirectement les chaînes écologiques. Cela pourrait conduire à l'apparition de nouveaux organismes nuisibles ou au développement d'organismes nuisibles résistants attribuables à la nouvelle physiologie ou à la nouvelle morphologie des arbres transgéniques. Il faut se garder de sous-estimer de telles conséquences qui doivent être prise en considération en fonction du milieu dans lequel les arbres transgéniques seront situés.

Le troisième problème potentiel surgit lorsqu'on imagine un scénario où des sujets transgéniques deviendraient des espèces nuisibles. Par exemple, on peut concevoir que l'introduction d'un nouveau gène qui confère une résistance à un herbicide ou à un insecte, conférerait, par le fait même, un avantage écologique aux arbres transgéniques; cet avantage pourrait donner lieu à l'invasion des écosystèmes par les arbres avantagés.

La pollution génétique des espèces naturelles constitue le quatrième problème qu'on associe à l'introduction d'arbres transgéniques; c'est le cas où le nouveau gène introduit serait transféré, par reproduction sexuée des arbres modifiés, à des sujets sauvages. Ce phénomène pourrait donner lieu à de graves problèmes au niveau des écosystèmes naturels par perturbation des équilibres dynamiques.

L'introduction de sujets génétiquement modifiés signifie logiquement l'emploi de populations clonales en vue du reboisement. En outre des effets précités, il existe le problème potentiel de l'amenuisement du pool génétique; cela pourrait avoir de graves conséquences. De toute évidence,

cela diminuerait l'adaptabilité des espèces génétiquement manipulées. Comme stratégies de neutralisation des incidences négatives associées à une population clonée, on peut avoir recours à des mélanges de clones et à la création de réserves écologiques. Ce problème ne se trouve pas limité à l'introduction d'arbres transgéniques, mais à l'utilisation de propagules obtenues à partir de cultures tissulaires à grande échelle.

Ce que nous venons de dire constitue une courte introduction aux incidences écologiques potentielles de l'utilisation d'espèces forestières génétiquement manipulées. Avec l'apparition de méthodes efficaces de production d'arbres transgéniques, il faudra se pencher sérieusement sur les répercussions éventuelles et évaluer les risques en fonction des milieux touchés. Il faudra élaborer des règlements appropriés qui tiendront compte notamment des différences qui existent entre les plantes vivrières et les espèces forestières.

7. RÉGLEMENTATION RELATIVE À L'ESSAI ET À LA MISE EN CIRCULATION DES ARBRES TRANSGÉNIQUES AU CANADA

Au moment de la rédaction de ce rapport, il n'existait pas de règlement qui traitait spécifiquement de l'essai et de la mise en circulation d'arbres transgéniques au Canada. Des lignes directrices ont été élaborées par la Division des semences d'Agriculture Canada pour les espèces vivrières, et il est possible de se procurer des permis en s'adressant à ce Service. Toutefois, ces lignes directrices ne visent pas les espèces forestières et les plantes horticoles. Elles n'ont aucune force de loi sinon par l'intermédiaire de l'enregistrement des variétés. Cependant, le gouvernement du Canada entend adopter des règlements adéquats d'ici 1992 (comme le Plan vert du Canada en fait état).

Dans le cas des plantes transgéniques couvertes par les lignes directrices d'Agriculture Canada, la définition est comme suit : «les organismes génétiquement modifiés sont les organismes dont le bagage génétique a été changé et qui possèdent de nouveaux caractères ou caractéristiques nécessitant une évaluation distincte de conformité, au regard du risque pour la santé humaine ou pour l'environnement (p. ex., tolérance à des organismes nuisibles, tolérance au stress ou changements de composition qui dépassent la norme fixée au niveau de l'espèce (ou de la variété) et qui pourraient présenter un risque potentiel)» (Kalous et Duke, 1989). Le tableau 15 donne un aperçu des grandes lignes pour réglementer et orienter la recherche et les essais ainsi que la mise en circulation des plantes transgéniques.

Tableau 15. Stades de développement et mécanismes possibles de contrôle de matériel végétal génétiquement modifié

Stade de développement	Mécanisme possible de contrôle
Laboratoire et serre	Lignes directrices
Essais sur le terrain à petite échelle	Lignes directrices/comité consultatif
Essais sur le terrain à grande échelle	Règlement
Commercialisation	Règlement

Source : Kalous et Duke (1989).

Dans le cas des essais sur le terrain d'une plante vivrière, le mécanisme est le suivant :

1. Présentation d'une lettre d'intention et des renseignements requis (tableau 16) au directeur de la Division des semences (Direction générale de la production et de l'inspection des aliments, Agriculture Canada, Ottawa).
2. Examen par les responsables de l'application, au cas par cas, avec la collaboration d'autres organismes, le cas échéant (Santé et Bien-être social Canada, Environnement Canada).
3. Autorisation accordée par le directeur de la Division des semences.
4. Inspection des lieux pendant et après les essais.

À cause des différences biologiques qui séparent les plantes vivrières des espèces forestières, il est urgent de mettre au point des règles spécifiquement destinées à l'essai et à la mise en circulation d'arbres transgéniques au Canada. De la recherche en ce domaine se fait par Forêts Canada, et des lignes directrices ou un règlement sont en voie d'élaboration. Toutefois, la condition essentielle demeure l'adoption d'une loi sur l'homologation des semences d'espèces forestières.

Tableau 16. Renseignements requis en vue d'une demande d'importation et d'essai sur le terrain de matériel végétal génétiquement transformé

1. Nom de la variété de la plante, notamment capacité de pollinisation croisée avec des membres de la même espèce ainsi que des organismes indigènes apparentés, et description de la variété.

2. Description du donneur de gènes.

3. Nome du gène manipulé, identité du produit protéinique et effet du gène sur la plante; description complète du gène, notamment la séquence de base et les voies métaboliques modifiées.

4. Description du système de transformation :
   i) identité des vecteurs et des échafaudages plasmidiques
   ii) identification des caractéristiques des plasmides; façon de désarmer et marqueurs
   iii) description des mécanismes de transfert et d'intégration.

5. Description des essais et analyses chimiques, biochimiques et statistiques effectués sur le matériel végétal, et résultats.

6. Description de l'endroit proposé pour la tenue des essais
   i) emplacement(s) géographique(s) exact(s)
   ii) grandeur et nombre de parcelles
   iii) quantité de graines (g) à planter
   iv) variété(s) de contrôle proposée(s)
   v) périmètre d'isolement.

7. Indication des techniques de surveillance des lieux, durant les essais comme après la récolte.

8. Jusqu'à quel stade de développement les plantes transgéniques pousseront-elles, p. ex., à quel stade le matériel végétal sera-t-il récolté (préflotaison, prématurité, etc.).

9. Traitement du sol après récolte
   i) labourage, brûlage ou agents chimiques
   ii) entente à l'effet qu'aucune espèce semblable ne sera plantée sur le terrain pour une période donnée (3-5 ans)
   iii) système de surveillance après la récolte

   i) traitement de tout matériel végétal restant
   ii) analyses du sol, au besoin
   iii) plantes spontanées.

10. Traitement du matériel végétal transgénique récolté et des semences.

11. Semences ou matériel végétal récolté
   i) destination/devenir
   ii) analyses à effectuer
   iii) détermination de la sûreté au regard des personnes et des animaux
   iv) efficacité.

12. Détermination des possibles répercussions sur le milieu attribuables aux essais sur le terrain.

Source : Kalous et Duke (1989).

8. RECHERCHE AU CANADA

Sept groupes participent activement à la recherche en génie génétique axée sur les espèces forestières au Canada (tableau 17). Ces groupes s'intéressent aux angiospermes et aux gymnospermes, et la recherche est principalement axée sur l'élaboration de méthodes de transformation génétique plutôt que sur des tentatives d'introduire des caractères utiles. Au moment de la rédaction de ce rapport, il n'y avait pas d'arbres transgéniques testés ou qu'on envisageait de tester au Canada (tableau 18). Cependant, aux États-Unis, il se fait présentement, ou se fera bientôt, des essais sur des sujets transgéniques du noyer et du peuplier (tableau 18).

Tableau 17. Groupes qui participent activement au génie génétique appliqué aux arbres au Canada

Directeur (s)	Endroit	Espèce
John Carlson	Université de Colombie-Britannique	*Populus* *Pinus*
Pierre Charest	Institut forestier national de Petawawa	*Populus* *Larix* *Picea*
David Dunstan	Institut de biotechnologie végétale	*Picea* *Pinus*
Larry Fowke	Université de Saskatchewan	*Picea*
Maurice Lalonde	Université Laval	*Betula*
Maurice Moloney/ Trevor Thorpe	Université de Calgary	*Picea*
Aladar Szalay	Université de l'Alberta	*Pinus* *Populus*

Tableau 18. Estimation des essais de plantes transgénique sur le terrain au Canada et aux États-Unis

Culture	Essais transgéniques (1990)		Demandes approuvées (1988-1990)	(1987-1990)
	Canada	É.-U.	Canada	É.-U.
Canola	8	-	26	-
Lin	2	-	10	-
Soya	-	1	-	8
Luzerne	1	1	4	4
Tomate	-	6	2	28
Pomme de terre	2	4	3	6
Tabac	2	5	3	18
Coton	0	6	-	13
Concombre	-	1	-	2
Cantaloupe/courge	-	2	-	7
Riz	-	2	-	3
Maïs	-	2	1	4
Peuplier	-	-	-	1
Noyer	-	1	-	1

REMERCIEMENTS

Les auteurs tiennent à témoigner leur reconnaissance à MM. Gordon Murray, feu Jack Pitel, Mme Linda DeVerno, MM. Rob Drysdale et Asoka Yapa, qui ont assuré une revue critique du manuscrit. Nous tenons à remercier M. Bon Yoo (Université du Nouveau-Brunswick) ainsi que M. Patrick von Aderkas (Université de Victoria), qui ont assuré des examens externes du manuscrit.

BIBLIOGRAPHIE

Ackermann, C. 1977. Pflanzen aus *Agrobacterium rhizogenes* - tumoren an *Nicotiana tabacum*. Plant Sci. Lett. 8:23-30.

Altenbach, S.B.; Pearson, K.W.; Meeker, G.; Staraci, L.C.; Sun, S.S.M. 1989. Enhancement of the methionine content of seed proteins by the expression of a chimeric gene encoding a methionine-rich protein in transgenic plants. Plant Mol. Biol. 13:513-522.

Alt-Moerbe, J.; Rak, B.; Schroder, J. 1986. A 3.6 Kbp segment from the VIR region of Ti plasmids contains genes responsible for border sequence-directed production of T region circles in *E. coli*. EMBO J. 5:1129-1135.

An, G. 1986. Development of plant promoter expression vectors and their use for analysis of differential activity of nopaline synthase promoter in transformed tobacco cells. Plant Physiol 81:86-89.

Anzai, H.; Yoneyama, K.; Yamaguchi, I. 1989. Transgenic tobacco resistant to a bacterial disease by the detoxification of a pathogenic toxin. Mol. Gen. Genet. 219:492-494.

Anzai, H.; Yoneyama, K.; Yamaguchi, I. 1990. The nuclotide sequence of tabtoxin resistance gene (ttr) of *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*. Nucleic Acids Res. 18:1890.

Anzai, H.; Yoneyama, K. 1990. Transgenic plant resistant to a bacterial disease by the detoxification of a pathogenic toxin. J. Pestic. Sci. 15:249-253.

Aronson, A.I.; Beckman, W.; Dunn, P. 1986. *Bacillus thuringiensis* and related insect pathogens. Microbiol. Rev. 50:1-24.

Ashby, A.M.; Watson, M.D.; Shaw, C.H. 1987. A Ti-plasmid determined function is responsible for chemotaxis of *Agrobacterium tumefaciens* towards the plant wound product acetosyringone. FEMS Microbiol. Lett. 41:189-192.

Ashby, A.M.; Watson, M.D.; Loake, G.J.; Shaw, C.H. 1988. Ti plasmid-specified chemotaxis of *Agrobacterium tumefaciens* C58C1 toward VIR-inducing phenolic compounds and soluble factors from monocotyledonous and dicotyledonous plants. J. Bacteriol. 170:4181-4187.

Baba, A.; Hasezawa, S.; Syono, K. 1986. Cultivation of rice protoplasts and their transformation mediated by *Agrobacterium* spheroplasts. Plant Cell Physiol. 27:471-473.

Barton, K.A.; Binns, A.N.; Matzke, A.J.M.; Chilton, M.D. 1983. Regeneration of intact tobacco plants containing full length copies of genetically engineering T-DNA, and transmission of T-DNA to R1 progeny. Cell 32:1033-1043.

Barton, K.A.; Whiteley, H.R.; Yang, N.S. 1987. *Bacillus thuringiensis*-endotoxin expressed in transgenic *Nicotiana tabacum* provides resistance to Lepidopteran insects. Plant Physiol. 85:1103-1109.

Basiran, N.; Armitage, P.; Scott, R.J.; Draper, J. 1987. Genetic transformation of flax (*Linum usitatissimum*) by *Agrobacterium tumefaciens*: regeneration of transformed shoots via a callus phase. Plant Cell Rep. 6:396-399.

Baulcombe, D.C.; Saunders, G.R.; Bevan, M.W.; Mayo, M.A.; Harrison, B.D. 1986. Expression of biologically active viral satellite RNA from the nuclear genome of transformed plants. Nature 321:446-449.

Bayer, V.E.; Gugel, K.H.; Hagele, K.; Hagenmaier, H.; Jessipow, S.; Konig, W.A.; Zahner, H. 1972. Phospinothricin und phosphinothyrcil-alanyl-alanin. Helv. Chim. Acta 55:224-239.

Beachy, R.N.; Loesch-Fries, S.; Tumer, N.E. 1990. Coat protein-mediated resistance against virus infection. Annu. Rev. Phytopathol. 28:451-474.

Bekkaoui, F.; Pilon, M.; Raju, D.S.S.; Crosby, W.L.; Dunstan, D.I. 1988. Transient gene expression in electroporated *Picea glauca* protoplasts. Plant Cell Rep. 7:481-484.

Bevan, M. 1984. Binary *Agrobacterium* vectors for plant transformation. Nucleic Acids Res. 12:8711-8721.

Bevan, M.; Barnes, W.M.; Chilton, M.D. 1983. Structure and transcription of the nopaline synthase gene region of T-DNA. Nucleic Acids Res. 11:369-379.

Bino, R.J.; Hille, J.; Franken, J. 1987. Kanamycin resistance during *in vitro* development of pollen from transgenic tomato plants. Plant Cell Rep. 6:333-336.

Birot, A.M.; Bouchez, D.; Casse-Delbart, F.; Durand-Tardif, M.; Jouanin, L.; Pautot, V.; Robaglia, C.; Tepfer, D.; Tepfer, J.; Tourneur, J.; Vilaine, F. 1987. Studies and uses of the Ri plasmids of *Agrobacterium rhizogenes*. Plant Physiol. Biochem. 25:323-335.

Boynton, J.E.; Gillham, N.W.; Harris, E.H.; Hosher, J.P.; Johnson, A.M.; Jones, A.R.; Randolph-Anderson, B.L.; Robertson, D.; Klein, T.M.; Shark, K.B.; Sanford, J.C. 1988. Chloroplast transformation in *Chlamydomonas* with high velocity microprojectiles. Science 240:1534-1538.

Bradshaw, H.N., Jr.; Parson, W.W.; Sheffer, M.; Lioubin, P.J.; Mulvihill, E.R.; Gordon, M.P. 1987. Design, construction and use of an electroporator for plant protoplasts and animal cells. Anal. Biochem. 166:342-348.

Brillanceau, M.H.; David, C.; Tempé, J. 1989. Genetic transformation of *Catharanthus roseus* G. Don. by *Agrobacterium rhizogenes*. Plant Cell Rep. 8:63-66.

Bruce, W.B.; Christensen, A.H.; Klein, T.; Fromm, M.; Quail, P.H. 1989. Photoregulation of a phytochrome gene promoter from oat transferred into rice by particle bombardment. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 86:9692-9696.

Bytebier, B.; Deboeck, F.; de Greve, H.; Van Montagu, M.; Hernalstreens, J.P. 1987. T-DNA organization in tumor cultures and transgenic plants of the monocotyledon *Asparagus officinalis*. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 84:5345-5349.

Caboche, M.; Deshayes, A. 1984. Utilisation de liposomes pour la transformation de protoplastes de mesophylle de tabac par un plasmide recombinant de *E. coli* leur conférant la resistance à la kanamycine. C.R. Acad. Sci. Paris (Sér. III) 299:663-666.

Campbell, M.A.; Pitel, J.; Rutledge, R.R.; Ellis, B. 1991. Cloning of a portion of the *Pinus banksiana* gene encoding phenylalanine ammonia-lyase. (In preparation.)

Cangelosi, G.A.; Jung, L.; Puvanesarajah, V.; Stacey, G.; Ozga, D.A.; Leigh, J.A.; Nester, E.W. 1987. Common loci for *Agrobacterium tumefaciens* and *Rhizobium meliloti* exopolysaccharide synthesis and their roles in plant interactions. J. Bacteriol. 169:2086-2091.

Casteels, P.; Ampe, C.; Jacobs, F.; Vaeck, M.; Tempts, P. 1989. Apidaecins: antibacterial peptides from honeybees. EMBO J. 8:2387-2391.

Catlin, D.; Ochoa, O.; McCormick, S.; Quiros, C.F. 1988. Celery transformation by *Agrobacterium tumefaciens*:

cytological and genetic analysis of transgenic plants. Plant Cell Rep. 7:100-103.

Charest, P.J.; Holbrook, L.A.; Gabard, J.; Iyer, V.N.; Miki, B.L. 1988. *Agrobacterium*-mediated transformation of thin cell layer explants from *Brassica napus* L. Theor. Appl. Genet. 75:438-448.

Charest, P.J.; Hattori, J.; DeMoor, J.; Iyer, V.N.; Miki, B.L. 1990. *In vitro* study of transgenic tobacco expressing wild type and mutant acetohydroxyacid synthase genes. Plant Cell Rep. 8:643-646.

Charest, P.J.; Devantier, Y.; Ward, C.; Schaffer, U.; Klimaszewska, K.K. 1991. Transient expression of foreign chimeric genes in the gymnosperm hybrid larch following electroporation. Can. J. Bot. (in press).

Chee, P.P. 1990. Transformation of *Cucumis sativus* tissue by *Agrobacterium tumefaciens* and the regeneration of transformed plants. Plant Cell Rep. 9:245-248.

Chen, W.H.; Gartland, K.M.A.; Davey, M.R.; Sotak, R.; Gartland, J.S.; Mulligan, B.J.; Power, J.B.; Cocking, E.C. 1987. Transformation of sugarcane protoplasts by direct uptake of a selectable chimaeric gene. Plant Cell Rep. 6:297-301.

Cheung, A.Y.; Bogarad, L.; Van Montagu, M.; Schell, J. 1988. Relocating a gene for herbicide tolerance: a chloroplast gene is converted into a nuclear gene. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 85:391-395.

Chilton, M.D.; Drummond, M.H.; Merlo, D.J.; Sciaky, D.; Montoya, A.L.; Gordon, M.P.; Nester, E.W. 1977. Stable incorporation of plasmid DNA into higher plant cells: the molecular basis of crown gall tumorigenesis. Cell 11:263-271.

Chilton, M.D.; Tepfer, D.A.; Petit, A.; David, C.; Casse-Delbart, F.; Tempé, J. 1982. *Agrobacterium rhizogenes* inserts T-DNA into the genome of the host plant root cells. Nature 295:432-434.

Christie, P.J.; Ward, J.E.; Winans, S.C.; Nester, E.W. 1988. The *Agrobacterium tumefaciens* VIR E2 gene product is a single stranded DNA binding protein that associated with T-DNA. J. Bacteriol. 170:2659-2667.

Christou, P.; McCabe, D.E.; Swain, W.F. 1988. Stable transformation of soybean callus by DNA-coated gold particles. Plant Physiol. 87:671-674.

Christou, P.; Swain, W.F.; Yang, N.S.; McCabe, D.E. 1989. Inheritance and expression of foreign genes in transgenic soybean plants. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 86:7500-7504.

Chun, Y.W.; Klopjenstein, N.B.; McNabb, H.S., Jr.; Hall, R.B. 1988. Transformation of *Populus* species by an *Agrobacterium* binary vector system. J. Korean For. Soc. 77:199-207.

Chupeau, M.C.; Bellini, C.; Guerche, P.; Maisonneuve, B.; Vastra, G.; Chupeau, Y. 1989. Transgenic plants of lettuce (*Lactuca sativa*) obtained through electroporation of protoplasts. BioTechnology 7:503-508.

Clapham, D.; Ekberg, I.; Eriksson, G.; Hood, E.E.; Norell, L. 1990. Within-population variation in susceptibility to *Agrobacterium tumefaciens* A281 in *Picea abies* (L.) Karst. Theor. Appl. Genet. 79:654-656.

Clapham, D.H.; Ekberg, I. 1986. Induction of tumours by various strains of *Agrobacterium tumefaciens* on *Abies nordmanniana* and *Picea abies*. Scand. J. For. Res. 1:435-437.

Close, T.J.; Tait, R.C.; Kado, C.I. 1985. Regulation of Ti plasmid virulence genes by a chromosomal locus of *Agrobacterium tumefaciens*. J. Bacteriol. 164:774-781.

Coen, D.J.; Bedbrook, J.; Bogorad, L.; Rich, A. 1977. Maize chloroplast DNA fragment encoding the large subunit of ribulosebisphosphate carboxylase. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 74:5487-5491.

Comai, L.; Facciotti, D.; Hiatt, W.R.; Thompson, G.; Rose, R.E.; Stalker, D.M. 1985. Expression in plants of a mutant *aroA* gene from *Salmonella typhimurium* confers tolerance to glyphosate. Nature 317:741-744.

Crossway, A.; Oakes, J.V.; Irvine, J.M.; Ward, B.; Knauf, V.C.; Shewmaker, C.K. 1986. Integration of foreign DNA following microinjection of tobacco mesophyll protoplasts. Mol. Gen. Genet. 202:179-185.

Cullis, C.A.; Greissen, G.P.; Gorman, S.W.; Teasdale, R.D. 1988. The 25S, 18S, and 5S ribosomal RNA genes from *Pinus radiata* D. Don. Pages 34-40 in Cheliak, W.M.; Yapa, A.C., eds. Molecular genetics of forest trees. PNFI Inf. Rep. PI-X-80.

Cuozzo, M.; O'Connell, K.M.; Kaniewski, W.; Fang, R.X.; Chua, N.H.; Tumer, N.E. 1988. Viral protection in transgenic tobacco plants expressing the cucumber mosaic virus coat protein or its antisense RNA. BioTechnology 6:549-557.

Dandekar, A.M.; Gupta, P.K.; Durzan, D.J.; Knauf, V. 1987. Transformation and foreign gene expression in micropropagated Douglas-fir (*Pseudotsuga menziesii*). BioTechnology 5:587-590.

Das, A. 1988. *Agrobacterium tumefaciens* VIR E operon encodes a single-stranded DNA-binding protein. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 85:2909-2913.

David, C.; Tempé, J. 1988. Genetic transformation of cauliflower (*Brassica oleracea* L. var. *Botrytis*) by *Agrobacterium rhizogenes*. Plant Cell Rep. 7:88-91.

David, C.; Chilton, M.D.; Tempé, J. 1984. Conservation of T-DNA in plants regenerated from hairy root cultures. BioTechnology 2:73-76.

Davies, J.W.; Towsend, R.; Stanley, J. 1987. The structure, expression, functions and possible exploitation of gemini virus genomes. Pages 31-52 *in* Hohn, T.; Schell, J. eds. Plant DNA infectious agents. Springer-Verlag, New York, NY.

Davis, J.M.; Keathley, D.E. 1989. Detection and analysis of T-DNA in crown gall tumours and kanamycin-resistant callus of *Robinia pseudoacacia*. Can. J. For. Res. 19:1118-1123.

Davis, R.D. 1984. Cadmium in sludges used as fertilizer. Experientia 40:117-126.

Deak, M.; Kiss, G.B.; Koncz, C.; Dudits, D. 1986. Transformation of *Medicago* by *Agrobacterium*-mediated gene transfer. Plant Cell Rep. 5:97-100.

Deblaere, R.; Bytebier, B.; De Greve, H.; Deboeck, F.; Schell, J.; Van Montagu, M.; Leemans, J. 1985. Efficient octopine Ti plasmid-derived vectors for *Agrobacterium*-mediated gene transfer to plants. Nucleic Acids Res. 13:4777-4788.

De Block, J.; Botterman, J.; Vandewiele, M.; Dock, J.; Thoen, C.; Gosselé, V.; Mo, N.R.; Thompson, C.; Van Montagu, M.; Leemans, J. 1987. Engineering herbicide resistance in plants by expression of a detoxifying enzyme. EMBO J. 6:2513-2518.

De Block, M. 1990. Factors influencing the tissue culture and the Agrobacterium tumefaciens-mediated transformation of hybrid aspen and poplar clones. Plant Physiol. 93:1110-1116.

De Block, M.; Herrera-Estrella, L.; Van Montagu, M.; Schell, J.; Zambryski, P. 1984. Expression of foreign genes in regenerated plants and in their progeny. EMBO J. 3:1681-1689.

De Block, M.; Schell, J.; Van Montagu, M. 1985. Chloroplast transformation by *Agrobacterium tumefaciens*. EMBO J. 4:1367-1372.

De Cleene, M. 1985. The susceptibility of monocotyledons to *Agrobacterium tumefaciens*. Phytopath. Z. 113:81-89.

De Cleene, M.; De Ley, J. 1976. The host range of crown gall. Bot. Rev. 42:389-466.

De Cleene, M.; De Ley, J. 1981. The host range of infectious hairy-root. Bot. Rev. 47:147-194.

De Greve, H.; Dhaese, P.; Seurinck, J.; Lemmers, M.; Van Montagu, M.; Schell, J. 1983. Nucleotide sequence and transcript map of the *Agrobacterium tumefaciens* T-plasmid encoded octopine synthase gene. J. Mol. Appl. Genet. 1:499-511.

Delannay, X.; LaVallee, B.J.; Proksch, R.K.; Fuchs, R.L.; Sims, S.R.; Greenplate, J.T.; Marrone, P.A.; Dodson, R.B.; Augustine, J.J.; Layton, J.G.; Fischhoff, D.A. 1989. Field performance of transgenic tomato plants expressing *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* insect control protein. BioTechnology 7:1265-1269.

De La Pena, J.; Lörz, H.; Schell, J. 1987. Transgenic rye plants obtained by injecting DNA into young floral tillers. Nature 325:274-276.

Della-Cioppa, G.; Bauer, S.C.; Taylor, M.L.; Rochester, D.E.; Klein, B.K.; Shah, D.M.; Fraley, R.T.; Kishore, G.M. 1987. Targeting a herbicide-resistant enzyme from *Escherichia coli* to chloroplasts of higher plants. BioTechnology 5:579-584.

Depicker, A.; Stachel, S.; Dhaese, P.; Zambryski, P.; Gordman, H.M. 1983. Nopaline synthase: transcript mapping and DNA sequence. J. Mol. Appl. Genet. 1:561-573.

Deshayes, A.; Herrera-Estrella, L.; Caboche, M. 1985. Liposome-mediated transformation of tobacco mesophyll protoplasts by an *Escherichia coli* plasmid. EMBO J. 4:2731-2737.

D'Halluin, K.; Botterman, J.; De Greef, W. 1990. Engineering of herbicide-resistant alfalfa and evaluation under field conditions. Crop. Sci. 30:866-871.

Diner, A.M.; Karnosky, D.F. 1987. Differential responses of two conifers to *in vitro* inoculation with *Agrobacterium rhizogenes*. Eur. J. For. Path. 17:211-216.

Di Rita, V.J.; Gelvin, S.B. 1987. Deletion analysis of the mannopine synthase gene promoter in sunflower crown gall tumors and *Agrobacterium tumefaciens*. Mol. Gen. Genet. 207:233-241.

Douglas, C.J.; Staneloni, R.J.; Rubin, R.A.; Nester, E.W. 1985. Identification and genetic analysis of an *Agrobacterium tumefaciens* chromosomal virulence region. J. Bacteriol. 161:850-860.

Duan, X.; Chen, S. 1985. Variation of the characters in rice (*Oryza sativa*) induced by foreign DNA uptake. China Agr. Sci. 3:6-9.

Duchesne, L.C.; Charest, P.J. 1991. Transient expression of the b-glucuronidase gene in embryogenic callus

of *Picea mariana* following micro-projection. Plant Cell Rep. (in press).

Eckes, P.; Rosahl, S.; Schell, J.; Willmitzer, L. 1986. Isolation and characterization of a light-inducible, organ-specific gene from potato and analysis of its expression after tagging and transfer into tobacco and potato shoots. Mol. Gen. Genet. 205:14-22.

Eckes, P.; Donn, G.; Wengenmayer, F. 1987. Genetic engineering with plants. Am. Gen. Chem. Int. Ed. Eng. 26:382-402.

Eckes, P.; Schmitt, P.; Daub, W.; Wengenmayer, F. 1989. Overproduction of alfalfa glutamine synthetase in transgenic tobacco plants. Mol. Gen. Genet. 217:263-268.

Edwards, D.G.W.; Pollard, D.F.W.; Wang, B.S.P. 1988. Guidelines for grading and labelling forest tree seeds in Canada. For. Chron. 64:334-344.

Eichholtz, D.A.; Rogers, S.G.; Horsch, R.B.; Klee, H.J.; Hayford, M.; Hoffmann, N.L.; Braford, S.B.; Fink, C.; Flick, J.; O'Connel, K.M.; Fraley, R.T. 1987. Expression of mouse dihydrofolate reductase gene confers methotrexate resistance in transgenic petunia plants. Somatic Cell Mol. Genet. 13:67-76.

Ellis, D.; Roberts, D.; Sutton, B.; Lazaroff, W.; Webb, D.; Flinn, B. 1989. Transformation of white spruce and other conifer species by *Agrobacterium tumefaciens*. Plant Cell Rep. 8:16-20.

Everett, N.P.; Robinson, K.E.P.; Mascarenhas, D. 1987. Genetic engineering of sunflower (*Helianthus annuus* L.). BioTechnology 5:1201-1204.

Fang, G.; Grumet, R. 1990. *Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation and regeneration of muskmelon plants. Plant Cell Rep. 9:160-164.

Feldman, K.A.; Marks, M.D. 1987. *Agrobacterium*-mediated transformation of germinating seeds of *Arabidopsis thaliana:* non-tissue culture approach. Mol. Gen. Genet. 208:1-9.

Filipone, E.; Lurquin, P.F. 1989. Stable transformation of eggplant (*Solanum melongena* L.) by cocultivation of tissues with *Agrobacterium tumefaciens* carrying a binary plasmid vector. Plant Cell Rep. 8:370-373.

Fillatti, J.A.; Kiser, J.; Rose, R.; Comai, L. 1987a. Efficient transfer of a glyphosate tolerance gene into tomato using a binary Agrobacterium tumefaciens vector. BioTechnology 5:726-730.

Fillatti, J.A.; Sellmer, J.; McCown, B.; Haissig, B.; Comai, L. 1987b. *Agrobacterium*-mediated transformation and regeneration of *Populus*. Mol. Gen. Genet. 206:192-199.

Finer, J.J.; McMullen, M.D. 1990. Transformation of cotton (*Gossypium hirsutum* L.) via particle bombardment. Plant Cell Rep. 8:586-589.

Firoozabady, E.; Deboer, D.L.; Merlo, D.J.; Halk, E.L.; Amerson, L.N.; Rashka, K.E.; Murray, E.E. 1987. Transformation of cotton (*Gossypium hirsutum* L.) by *Agrobacterium tumefaciens* and regeneration of transgenic plants. Plant Mol. Biol. 10:105-116.

Fischhoff, D.A.; Bandish, K.S.; Perlak, F.J.; Marrone, P.G.; McCormick, S.M.; Niedermeyer, J.G.; Dean, D.A.; Kusano-Kretzmer, K.; Mayer, E.J.; Rochester, D.E.; Rogers, S.G.; Fraley, R.T. 1987. Insect tolerant transgenic tomato plants. BioTechnology 5:807-813.

Fraley, R.T. 1983. Liposome-mediated delivery of tobacco mosaic virus RNA into petunia protoplast. Plant Mol. Biol. 2:5-14.

Fraley, R.T.; Rogers, S.G.; Horsch, R.B.; Sanders, P.R.; Flick, J.S.; Adams, S.P.; Bittner, M.L.; Brand, L.A.; Fink, C.L.; Fry, J.S.; Galluppi, G.R.; Goldberg, S.B.; Hoffmann, N.L.; Woo, S.C. 1983. Expression of bacterial genes in plant cells. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 80:4803-4807.

Fraley, R.T.; Rogers, S.G.; Horsch, R.B.; Eichholtz, D.A.; Flick, J.S.; Fink, C.L.; Hoffman, N.L.; Sanders, P.R. 1985. The SEV system: a new disarmed Ti plasmid vector system for plant transformation. BioTechnology 3:629-635.

Freeman, J.P.; Draper, J.; Davey, M.R.; Cocking, E.C.; Gartland, K.M.A.; Harding, K.; Pental, D. 1984. A comparison of methods for plasmid delivery into plant protoplasts. Plant Cell Physiol. 25:1353-1365.

Fromm, M.E.; Taylor, L.P.; Walbot, V. 1986. Stable transformation of maize after gene transfer by electroporation. Nature 319:791-793.

Fry, J.; Barnason, A.; Horsch, R.B. 1987. Transformation of *Brassica napus* with *Agrobacterium tumefaciens* based vectors. Plant Cell Rep. 6:321-325.

Fulton, R.W. 1986. Practices and precautions in the use of cross protection for plant virus disease control. Annu. Rev. Phytopathol. 26:67-81.

Gabard, J.M.; Charest, P.J.; Iyer, V.N.; Miki, B.L. 1989. Cross-resistance to short residual sulfonylurea herbicides in transgenic tobacco plants. Plant Physiol. 91:574-580.

Garcia-Olmedo, F.O.; Salcedo, G.; Sanchez-Monge, R.; Gomez, L.; Royo, J.; Carbonero, P. 1987. Plant proteinaceous inhibitors of proteinases and ∝-amylases. Oxf. Surv. Plant Mol. Cell Biol. 4:275-334.

Gardner, R.C.; Knauf, V.C. 1986. Transfer of *Agrobacterium* DNA to plants requires a T-DNA border but not the VIR E locus. Science 231:725-727.

Gerlach, W.L.; Llewellyn, D.; Haseloff, J. 1987. Construction of a plant disease resistance gene from the satellite RNA of tobacco ringspot virus. Nature 328:802.

Ghai, J.; Das, A. 1989. The VIR D operon of *Agrobacterium tumefaciens* Ti plasmid encodes a DNA-relaxing enzyme. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 86:3109-3113.

Gordon-Kamm, W.J.; Spencer, T.M.; Mangano, M.L.; Adams, T.R.; Daines, R.J.; Start, W.G.; O'Brien, J.V.; Chambers, S.A.; Adams, W.R., Jr.; Willets, N.G.; Rice, T.B.; Mackey, C.J.; Krueger, R.W.; Kausch, A.P.; Lemaux, P.G. 1990. Transformation of maize cells and regeneration of fertile transgenic plants. Plant Cell 2:603-618.

Graham, J.; McNicol, R.J. 1991. Regeneration and transformation of Ribes. Plant Cell Tissue Organ Cult. 24:91-95.

Grill, E.; Winnacker, E.L.; Zenk, M.H. 1985. Phytochelatines: the principal heavy-metal complexing peptides of higher plants. Science 230:674-676.

Grimsley, N.; Bisaro, D. 1987. Agroinfection Pages 88-109 in Hohn, T.; Schell, J., eds. Plant DNA infectious agents. Springer-Verlag, New York, NY.

Grist, R.; Butler, L. 1983. Effect of transforming DNA on growth and frequency of mutation of *Streptococcus pneumonias*. J. Bacteriol. 153:153-162.

Gronenborn, B. 1987. The molecular biology of cauliflower mosaic virus and its application as plant gene vector. Pages 1-29 *in* Hohn, T.; Schell, J., eds. Plant DNA infectious agents. Springer-Verlag, New York, NY.

Guerche, P.; Bellini, C.; Le Moullec, J.M.; Caboche, M. 1987a. Use of a transient expression assay for the optimization of direct gene transfer into tobacco mesophyll protoplasts by electroporation. Biochimie 69:621-628.

Guerche, P.; Charbonnier, M.; Jouanin, L.; Tourneur, C.; Paszkowski, J.; Pelletier, G. 1987b. Direct gene transfer by electroporation in *Brassica napus*. Plant Sci. 52:111-116.

Guerche, P.; Jouanin, L.; Tepfer, D.; Pelletier, G. 1987c. Genetic transformation of oilseed rape (*Brassica napus*) by the Ri T-DNA of *Agrobacterium rhizogenes* and analysis of inheritance of the transformed phenotype. Mol. Gen. Genet. 206:382-386.

Guerche, P.; De Almeida, E.R.P.; Schwarztein, M.A.; Gander, E.; Krebbers, E.; Pelletier, G. 1990. Expression of the 2S albumin from *Bertholletia excelsa* in *Brassica napus*. Mol. Gen. Genet. 221:306-314.

Guerineau, F.; Brooks, L.; Meadows, J.; Lucy, A.; Robinson, C.; Mullineaux, P. 1990. Sulfonamide resistance gene for plant transformation. Plant Mol. Biol. 15:127-136.

Gupta, P.K.; Dandekar, A.M.; Durzan, D.J. 1988. Somatic proembryo formation and transient expression of a luciferase gene in Douglas-fir and loblolly pine protoplasts. Plant Sci. 58:85-92.

Guri, A.; Sink, K.C. 1988. *Agrobacterium* transformation of eggplant. J. Plant Physiol. 133:52-55.

Hain, R.; Steinbiss, H.H.; Schell, J. 1984. Fusion of *Agrobacterium* and *E. coli* spheroplasts with *Nicotiana tabacum* protoplasts - direct gene transfer from microorganism to higher plants. Plant Cell Rep. 3:60-64.

Hamilton, A.J.; Lycett, G.W.; Grierson, D. 1990. Antisense gene that inhibits synthesis of the hormone ethylene in transgenic plants. Nature 346:284-287.

Hammerschlag, F.A.; Owens, L.D.; Smigocki, A.C. 1989. *Agrobacterium*-mediated transformation of peach cells derived from mature plants that were propagated in vitro. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 114(3):508-510.

Hanisch Ten Cate, C.H.; Ennik, E.; Roest, S.; Sree Ramulu, K.; Dijkhuis, P.; De Groot, B. 1988. Regeneration and characterization of plants from potato root lines transformed by *Agrobacterium rhizogenes*. Theor. Appl. Genet. 75:452-459.

Harpster, M.H.; Towsend, J.A.; Jones, J.O.G.; Bedbrook, J.; Dunsmuir, P. 1988. Relative strengths of the 35 cauliflower mosaic virus, 1^1, 2^1, and nopaline synthase promoters in transformed tobacco sugarbeet and oilseed rape callus tissue. Mol. Gen. Genet. 212:182-190.

Harrison, B.D.; Mayo, M.A.; Baulcombe, D.C. 1987. Virus resistance in transgenic plants that express cucumber mosaic virus satellite RNA. Nature 328:799-805.

Hasezawa, S.; Nagata, T.; Syono, K. 1981. Transformation of *Vinca* protoplasts mediated by *Agrobacterium* spheroplasts. Mol. Gen. Genet. 182:206-210.

Hasezawa, S.; Matsui, C.; Nagata, T.; Syono, K. 1983. Cytological study of the introduction of

Agrobacterium tumefaciens spheroplasts into *Vinca rosea* protoplasts. Can. J. Bot. 61:1052-1057.

Haughn, G.W.; Smith, J.; Mazur, B.; Somerville, C. 1988. Transformation with a mutant *Arabidopsis* acetolactate synthase gene renders tobacco resistant to sulfonylurea herbicides. Mol. Gen. Genet. 211:266-271.

Hauptmann, R.M.; Ozias-Akins, P.; Vasil, V.; Tabaeizadeh, Z.; Rogers, S.G.; Horsch, R.B.; Vasil, I.K.; Fraley, R.T. 1987. Transient expression of electroporated DNA in monocotyledonous and dicotyledonous species. Plant Cell Rep. 6:265-270.

Hayford, M.B.; Medford, J.I.; Hoffman, N.L.; Rogers, S.G.; Klee, J.H. 1988. Development of a plant transformation selection system based on expression of genes encoding gentamicin acetyltransferase. Plant Physiol. 86:1216-1222.

Helmer, G.; Casadaban, M.; Bevan, M.; Kayes, L.; Chilton, M.D. 1984. A new chimeric gene as a marker for plant transformation: the expression of *Escherichia coli* β-galactosidase in sunflower and tobacco cells. BioTechnology 2:520-527.

Hemenway, C.; Fang, R.X.; Kaniewski, W.K.; Chua, N.H.; Turner, N.E. 1988. Analysis of the mechanism of protection in transgenic plants expressing the potato virus X coat protein or its antisense RNA. EMBO J. 7:1273-1280.

Herrera-Estrella, L.; De Block, M.; Messens, E.; Hernalsteens, J.P.; Van Montagu, M.; Schell, J. 1983. Chimeric genes as dominant selectable markers in plant cells. EMBO J. 2:987-995.

Hiatt, A.; Cafferkey, R.; Bowdish, K. 1989. Production of antibodies in transgenic plants. Nature 342:76-78.

Hidaka, T.; Omura, M.; Ugaki, M.; Tomiyama, M.; Kato, A.; Ohshima, M.; Motoyoshi, F. 1990. *Agrobacterium*-mediated transformation and regeneration of *Citrus* spp. from suspension cells. Jpn. J. Breed. 40:199-207.

Hilder, V.A.; Gatehouse, A.M.R.; Sherrman, S.E.; Barker, R.F.; Boulter, D. 1987. A novel mechanism of insect resistance engineered into tobacco. Nature 330:160-163.

Hille, J.; Verheggen, F.; Roelvink, P.; Franseen, H.; Van Kammen, A.; Zabel, P. 1986. Bleomycin resistance: a new dominant selectable marker for plant cell transformation. Plant Mol. Biol. 7:171-176.

Hinchee, M.A.; Connor-Ward, D.V.; Newell, C.A.; McDonnell, R.E.; Sato, S.J.; Gasser, C.S.; Fischhoff, D.A.; Re, O.B.; Fraley, R.T.; Horsch, R.B. 1988. Production of transgenic soybean plants using *Agrobacterium*-mediated DNA transfer. BioTechnology 6:915-922.

Hipkins, V.D.; Tsai, C.H.; Strauss, S.H. 1990. Sequence of the gene for the large subunit of ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase from a gymnosperm, Douglas-fir. Plant. Mol. Biol. 15:505-507.

Hirooka, J.; Rogowsky, P.M.; Kado, C.I. 1987. Characterization of the *Vir E* locus of *Agrobacterium tumefaciens* plasmid pTi C58. J. Bacteriol. 169:1529-1536.

Hirooka, T.; Kado, C.I. 1986. Location of the right boundary of the virulence region on *Agrobacterium tumefaciens* plasmid pTi C58 and a host specifying gene next to the boundary. J. Bacteriol. 168:237-243.

Hoekema, A.; Hirsch, P.R.; Hooykaas, P.J.J.; Schilperoort, R.A. 1983. A binary plant vector strategy based on separation of VIR- and T-region of the *Agrobacterium tumefaciens* Ti-plasmid. Nature 303:179-180.

Holbrook, L.A.; Haffner, M.; Miki, B.L. 1986. A sensitive fluorographic method for the detection of nopaline and octopine synthase activities in *Brassica* crown-gall tissues. Biochem. Cell Biol. 64:126-132.

Hood, E.E.; Helmer, G.L.; Fraley, R.T.; Chilton, M.D. 1986. The hypervirulence of *Agrobacterium tumefaciens* A281 is encoded in a region of pTi BO542 outside of T-DNA. J. Bacteriol. 178:1291-1301.

Hood, E.E.; Clapham, D.H.; Ekberg, I.; Johannson, T. 1990. T-DNA presence and opine production in turmors of *Picea abies* (L.) Karst induced by *Agrobacterium tumafaciens* A281. Plant Mol. Biol. 14:111-117.

Horn, M.E.; Shillito, R.D.; Conger, B.V.; Harms, C.T. 1988. Transgenic plants of Orchard grass (*Dactylis glomerata* L.) from protoplasts. Plant Cell Rep. 7:469-472.

Horsch, R.B.; Fry, J.E.; Hoffmann, N.L.; Eichholtz, D.; Rogers, S.G.; Fraley, R.T. 1985. A simple and general method for transferring genes into plants. Science 227:1229-1231.

Howard, E.A.; Winsor, B.A.; DeVos, G.; Zambryski, P. 1989. Activation of the T-DNA transfer process in *Agrobacterium* results in the generation of a T-strand-protein complex: tight association of VIR D2 with the S1 ends of T-strands. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 86:4017-4021.

Huang, M.L.W.; Cangelosi, G.A.; Halperin, W.; Nester, E.W. 1990. A chromosomal *Agrobacterium*

tumefaciens gene required for effective plant signal transduction. J. Bacteriol. 172:1814-1822.

Hutchison, K.W.; Harrie, P.D.; Singer, P.B.; Brunner, A.F.; Greenwood, M.S. 1990. Nucleotide sequence of the small subunit of ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase from the conifer *Larix laricina*. Plant Mol. Biol. 14:281-284.

Imai, S.; Seto, H.; Sasaki, T.; Tsumoka, T.; Ogawa, H.; Satoh, A.; Inouye, S.; Niida, T.; Otake, N. 1985. Studies on the biosynthesis of bialaphos (SF-1293) 6. Production of N-acetyl-demethylphosphinotricin and N-acetylbialaphos by blocked mutants of *Streptomyces hygroscopicus* SF 1293 and their roles in the biosynthesis of bialaphos. J. Antibiot. 38:687-690.

James, D.J.; Passey, A.J.; Barbara, D.J.; Bevan, M. 1989. Genetic transformation of apple (*Malus pumila* Mill.) using a disarmed Ti-binary vector. Plant Cell Rep. 7:658-661.

Janssens, A.; Genetello, C.; Van Montagu, M.; Zambryski, P. 1986. Plant cells induce transcription of the *Agrobacterium tumefaciens* nopaline pTi C58 virulence region. Plant Sci. 47:185-193.

Jansson, S.; Gustafsson, P. 1990. Type I and type II genes for the chlorophyll a/b-binding protein in the gymnosperm *Pinus sylvestris* (Scots pine): cDNA cloning and sequence analysis. Plant Mol. Biol. 14:287-296.

Jayaswal, R.K.; Veluthambi, K.; Gelvin, S.B.; Slightom, J.L. 1987. Double-stranded cleavage of T-DNA and generation of single-stranded T-DNA molecules in *Escherichia coli* by a VIR D-encoded border specific endonuclease from *Agrobacterium tumefaciens*. J. Bacteriol. 169:5035-5045.

Jaynes, J.M.; Xanthopoulos, K.G.; Destefano-Beltran, L.; Dodds, J.H. 1987. Increasing bacterial disease resistance in plants utilizing antibacterial genes from insects. Bio Essays 6:236-270.

Jefferson, R.A.; Kavanagh, T.A.; Bevan, M.W. 1987. Gus fusions: β-glucuronidase as a sensitive and versatile gene marker in higher plants. EMBO J. 6:3901-3907.

Jia, S.R.; Yang, M.Z.; Ott, R.; Chua, N.H. 1989. High frequency transformation of *Kalanchoe laciniata*. Plant Cell Rep. 8:336-340.

Jin, S.; Komari, T.; Gordon, M.P.; Nester, E.W. 1987. Genes responsible for the supervirulence phenotype of *Agrobacterium tumefaciens* A281. J. Bacteriol. 169:4417-4425.

Johnston, S.A.; Amziano, P.Q.; Shark, K.; Sanford, J.C.; Butow, R.A. 1988. Mitochondrial transformation in yeast by bombardment with microprojectiles. Science 2540:1538-1541.

Jones, J.D.G.; Dunsmuir, P.; Bedbrook, J. 1985. High level expression of introduced chimaeric genes in regenerated transformed plants. EMBO J. 4:2411-2418.

Jones, J.D.G.; Grady, K.L.; Suslow, T.V.; Bedbrook, J.R. 1986. Isolation and characterization of genes encoding two chitinase enzymes from *Serratia marcescens*. EMBO J. 5:467-473.

Jones, J.D.G.; Svak, Z.; Harper, E.C.; Hurwitz, C.D.; Maliga, P. 1987. A dominant nuclear streptomycin resistance marker for plant cell transformation. Mol. Gen. Genet. 211:86-91.

Jones, J.G.; Dean, C.; Gidoni, D.; Gilbert, D.; Bond-Nutter, D.; Lee, R.; Bedbrook, J.; Dunsmuir, P. 1988. Expression of bacterial chitinase protein in tobacco leaves using two photosynthetic gene promoters. Mol. Gen. Genet. 212:536-542.

Jordan, M.C.; McHughen, A. 1988. Glyphosate tolerant flax plants from *Agrobacterium*-mediated gene transfer. Plant Cell Rep. 7:281-284.

Jouanin, L. 1984. Restriction map of an agropine-type Ri plasmid and its homologies with Ti plasmids. Plasmid 12:91-102.

Junker, B.; Zimmy, J.; Luhrs, R.; Lörz, H. 1987. Transient expression of chimaeric genes in dividing and non-dividing cereal protoplasts after PEG-induced DNA uptake. Plant Cell Rep. 6:329-332.

Kalous, M.J.; Duke, L.H. 1989. The regulation of plant biotechnology in Canada. Part 2. The environmental release of genetically altered plant material. Agriculture Canada, Ottawa, Canada.

Kaeppler, H.F.; Gu, W.; Somer, D.A.; Rines, H.W.; Cockburn, A.F. 1990. Silicon carbide fiber-mediated DNA delivery into plant cells. Plant Cell Rep. 9:415-418.

Karnosky, D.F.; Diner, A.M.; Barnes, W.M. 1988. A model system for gene transfer in conifers: european larch and *Agrobacterium* Pages 55-63 *in* Ahuja, M.R., ed. Somatic cell genetics of woody plants. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.

Kartha, K.K.; Chibbar, R.N.; Georges, F.; Leung, N.; Caswell, K.; Kendall, E.; Qureshi, J. 1989. Transient expression of chloramphenicol acetyltransferase (CAT) gene in barley cell cultures and immature embryos through microprojectile bombardment. Plant Cell Rep. 8:429-432.

Keeler, K.H. 1989. Can genetical engineered crops become weeds? Bio Technology 7:1134-1139.

Kenny, J.R.; Dancik, B.P.; Florence, L.Z.; Nargang, F.E. 1988. Nucleotide sequence of the carboxy-terminal portion of a lodgepole pine actin gene. Can. J. For. Res. 18:1595-1602.

Kiernan, J.M.; Goldberg, K.B.; Young, M.J.; Schoelz, J.E.; Sheperd, R.J. 1989. Transformation and regeneration of *Nicotiana edwardsonii*. Plant Sci. 64:67-78.

Klee, H.J.; Horsch, R.B.; Hinchee, M.A.; Hein, M.B.; Hoffmann, N.L. 1987a. The effects of overproduction of two *Agrobacterium tumefaciens* T-DNA auxin biosynthetic gene products in transgenic petunia plants. Genes Dev. 1:86-96.

Klee, H.J.; Muskopf, Y.M.; Gasser, C.S. 1987b. Cloning of an *Arabidopsis thaliana* gene encoding 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase: sequence analysis and manipulation to obtain glyphosate-tolerant plants. Mol. Gen. Genet. 210:437-442.

Klein, T.M.; Wolf, E.D.; Wu, R.; Sanford, J.C. 1987. High-velocity microprojectiles for delivering nucleic acids into living cells. Nature 327:70-73.

Klein, T.M.; Fromm, M.; Weissinger, A.; Tomes, D.; Schaaf, S.; Sletten, M.; Sanford, J.C. 1988a. Transfer of foreign genes into intact maize cells with high-velocity micro-projectiles. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 85:4305-4309.

Klein, T.M.; Gradziel, T.; Fromm, M.E.; Sanford, J.C. 1988b. Factors influencing gene delivery into *Zea mays* cells by high velocity microprojectiles. BioTechnology 6:559-563.

Klein, T.M.; Harper, E.C.; Srab, Z.; Sanford, J.C.; Fromm, M.E.; Maliga, P. 1988c. Stable genetic transformation of intact *Nicotiana* cells by the particle bombardment process. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 85:8502-8505.

Klein, T.M.; Kornstein, L.; Sanford, J.C.; Fromm, M.E. 1989a. Genetic transformation of maize cells by particle bombardment. Plant Physiol. 91:440-444.

Klein, T.M.; Roth, B.A.; Fromm, M.E. 1989b. Regulation of anthocyanin biosynthetic genes introduced into intact maize tissues by microprojectiles. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 86:6681-6685.

Knauf, V.; Yanofsky, M.; Montoya, A.; Nester, E. 1984. Physical and functional map of an *Agrobacterium tumefaciens* tumor-inducing plasmid that confers a narrow host range. J. Bacteriol. 160:564-568.

Kobayashi, S.; Uchimiya, H. 1989. Expression and integration of a foreign gene in orange (*Citrus sinensis* Osb.) protoplasts by direct DNA transfer. Jpn. J. Genet. 64:91-97.

Kohler, F.; Golz, C.; Eapen, S.; Kohn, N.; Schieder, O. 1987a. Stable transformation of moth bean *Vigna aconitifolia* via direct gene transfer. Plant Cell Rep. 6:313-317.

Kohler, F.; Golz, C.; Eapen, S.; Schieder, O. 1987b. Influence of plant cultivar and plasmid-DNA on transformation rates in tobacco and moth bean. Plant Sci. 53:87-91.

Koncz, C.; Schell, J. 1986. The promoter of TL-DNA gene 5 controls the tissue-specific expression of chimaeric genes carried by a novel type of *Agrobacterium* binary vector. Mol. Gen. Genet. 204:383-396.

Koncz, C.; Olsson, O.; Langridge, W.H.R.; Schell, J.; Szalay, A.A. 1987. Expression and assembly of functional bacterial luciferase in plants. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 84:131-135.

Koukolikova-Nicola, Z.; Shillito, R.O.; Hohn, B.; Wang, K.; Van Montagu, M.; Zambryski, P. 1985. Involvement of circular intermediates in the transfer of T-DNA from *Agrobacterium tumefaciens* to plant cells. Nature 313:191-196.

Koziel, M.G.; Adams, T.L.; Hazlet, M.A.; Damm, D.; Miller, J.; Dahlbeck, D.; Jayne, S.; Staskawicz, B.J. 1984. A cauliflower mosaic virus promoter directs expression of kanamycin resistance in morphogenic transformed plant cells. J. Mol. Appl. Genet. 2:549-562.

Kramer, M.; Sheely, R.E.; Hiatt, W.R. 1989. Progress towards the genetic engineering of tomato fruit softening. Trends Biotechnol. 7:191-194.

Kruger-Lebus, S.; Potrykus, I. 1987. A simple and efficient method for direct gene transfer to *Petunia hybrida* without electroporation. Plant Mol. Biol. Rep. 5:289-294.

Langridge, W.H.R.; Li, B.J.; Szalay, A.A. 1985. Electric field mediated stable transformation of carrot protoplasts with naked DNA. Plant Cell Rep. 4:355-359.

Lawson, C.; Kanienski, W.; Haley, L.; Rozman, R.; Newell, C.; Sanders, P.; Turner, N.E. 1990. Engineering resistance to mixed virus infection in a commercial potato cultivar: resistance to potato virus X and potato virus Y in transgenic Russet Burbank. BioTechnology 8:127-134.

Lawton, M.A.; Tierney, M.A.; Nakamura, I.; Anderson, E.; Komeda, Y.; Dubé, P.; Hoffman, N.; Fraley, R.T.; Beachy, R.N. 1987. Expression of a soybean β-conglycinin gene under the control of the cauliflower mosaic virus 35S and 19S promoters in transformed petunia tissues. Plant Mol. Biol. 9:315-324.

Lee, K.Y.; Townsend, J.; Tepperman, J.; Black, M.; Chui, C.F.; Mazur, B.; Dunsmuir, P.; Bedbrook, J. 1988. The molecular basis of sulfonylurea herbicide resistance in tobacco. EMBO J. 7:1241-1248.

Lefebvre, D.D.; Miki, B.L.; Laliberté, J.F. 1987. Mammalian metallothionein functions in plants. BioTechnology 5:1053-1056.

Leroux, B.; Yanofsky, M.F.; Winans, S.C.; Ward, J.E.; Ziegler, S.F.; Nester, E.W. 1987. Characterization of the VIR A locus of *Agrobacterium tumefaciens*: a transcriptional regulator and host range determinant. EMBO J. 6:849-856.

Lindholm, J.; Szmidt, A.; Gustafsson, P. 1988. Lack of one rDNA repeat and duplication of *psbA* in the chloroplast genome of lodgepole pine (*Pinus contorta* Dougl.) Pages 67-74 *in* Cheliak, W.M.; Yapa, A.C., eds. Molecular genetics of forest trees. PNFI Inf. Rep. PI-X-80.

Lindsay, K.; Gallois, P. 1990. Transformation of sugarbeet (*Beta vulgaris*) by *Agrobacterium tumefaciens*. J. Exp. Bot. 41:529-536.

Lippincott, J.A.; Lippincott, B.B.; Starr, M.P. 1981. The genus *Agrobacterium*. Pages 842-855 *in* Starr, M.P., et collab., eds. The prokaryotes: a handbook on habitats, isolation and identification of bacteria. Springer-Verlag, New York.

Lloyd, A.M.; Barnason, A.R.; Rogers, S.G.; Byrne, M.C.; Fraley, R.T.; Horsch, R.B. 1986. Transformation of *Arabidopsis thaliana* with *Agrobacterium tumefaciens*. Science 234:464-466.

Loake, G.L.; Ashby, A.M.; Shaw, C.H. 1988. Attraction of Agrobacterium tumefaciens C58C1 towards sugars involves a highly sensitive chemotaxis system. J. Gen. Microbiol. 134:1432.

Loesch-Fries, L.S.; Merlo, D.; Zinnen, T.; Burhop, L.; Hill, K.; Krahn, K.; Jarvis, N.; Nelson, S.; Halk, E. 1987. Expression of alfalfa mosaic virus RNA 4 in transgenic plants confers virus resistance. EMBO J. 6:1845-1851.

Loopstra, C.A.; Stomp, A.M.; Sederoff, R.R. 1990. *Agrobacterium*-mediated DNA transfer in sugar pine. Plant Mol. Biol. 15:1-9.

Loper, J.E.; Kado, C.I. 1979. Host-range conferred by the virulence-specifying plasmid of *Agrobacterium tumefaciens*. J. Bacteriol. 139:591-596.

Lörz, H.; Baker, B.; Schell, J. 1985. Gene transfer to cereal cells mediated by protoplast transformation. Mol. Gen. Genet. 199:178-182.

Ludwig, S.E.; Bowen, B.; Beach,L.; Wessler, S.R. 1990. A regulatory gene as a novel visible marker for maize transformation. Science 247:449-450.

Luo, Z.; Wu, R. 1989. A simple method for the transformation of rice via the pollen tube pathway. Plant Mol. Biol. Rep. 7:69-77.

Lyon, B.R.; Llewellyn, D.J.; Huppatz, J.L.; Dennis, E.S.; Peacock, W.J. 1989. Expression of a bacterial gene in transgenic tobacco plants confers resistance to the herbicide 2,4-dichlorophenoxyacetic acid. Plant Mol. Biol. 13:533-540.

Mackay, J.; Seguin, A.; Lalonde, M. 1988. Genetic transformation of 9 in vitro clones of *Alnus* and *Betula* by *Agrobacterium tumefaciens*. Plant Cell Rep. 7:229-232.

Maiti, I.B.; Hunt, A.G.; Wagner, G.J. 1988. Seed-transmissible expression of mammalian metallothionein in transgenic tobacco. Biochem. Biophys. Res. Commun. 150:640-647.

Manners, J.M. 1988. Transgenic plants of the tropical pasture legume *Stylosanthes humilis*. Plant Sci. 55:61-68.

Mariani, C.; De Beuckeleer, M.; Truettner, J.; Leemans, J.; Goldberg, R.B. 1990. Induction of male sterility in plants by a chimaeric ribonuclease gene. Nature 347:737-741.

Martin, G.C.; Miller, A.N.; Castle, L.A.; Morris, J.W.; Morris, R.O.; Dandekar, A.M. 1990. Feasibility studies using β-glucuronidase as a gene fusion marker in apple, peach and radish. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 115:686-691.

Mathews, H.; Bharathan, N.; Litz, R.E.; Narayanan, K.R.; Rao, P.S.; Bhatia, C.R. 1990a. The promotion of *Agrobacterium* mediated transformation in *Atropa belladona* L. by acetosyringone. J. Plant Physiol. 136:404-409.

Mathews, H.; Bharathan, N.; Litz, R.E.; Narayanan, K.R.; Rao, P.S.; Bhatia, C.R. 1990b. Transgenic plants of mustard *Brassica juncea* (L.) Czern and Coss. Plant Sci. 72:245-252.

Matsui, C.; Hasezawa, S.; Tanaka, N.; Syono, K. 1983. Introduction of *E. coli* cells and spheroplasts in Vinca protoplasts. Plant Cell Rep. 2:30-32.

Matthysse, A.G. 1983. Role of bacterial cellulose fibrils in *Agrobacterium tumefaciens* infection. J. Bacteriol. 154:906-915.

Matthysse, A.G. 1987. Characterization of nonattaching mutants of *Agrobacterium tumefaciens*. J. Bacteriol. 169:313-323.

Matthysse, A.G.; Holmes, K.V.; Gurlitz, R.H. 1981. Elaboration of cellulose fibrils by *Agrobacterium tumefaciens* during attachment to carrot cells. J. Bacteriol. 145:583-595.

Mazur, B.J.; Chui, C.F.; Smith, J.K. 1987a. Isolation and characterization of plant genes coding for acetolactate synthase, the target enzyme for two classes of herbicides. Plant Physiol. 85:1110-1117.

Mazur, B.J.; Falco, S.C.; Knowlton, S.; Smith, J.K. 1987b. Acetolactate synthase, the target enzyme of the sulfonylurea herbicides. *In* Von Wettstein, D.; Chua, N.H., eds. Plant Molecular Biology. Plenum Press, New York, NY.

McBride, K.E.; Knauf, V.C. 1988. Genetic analysis of the VIR E operon of the *Agrobacterium* Ti plasmid pTiA6. J. Bacteriol. 170:1430-1437.

McCabe, D.E.; Swain, W.F.; Martinell, B.J.; Christou, P. 1988. Stable transformation of soybean (*Glycine max*) by particle acceleration. BioTechnology 6:923-926.

McCormick, S.; Niedermeyer, J.; Fry, J.; Barnason, A.; Horsch, R.; Fraley, R. 1986. Leaf disc transformation of cultivated tomato (*L. esculentum*) using *Agrobacterium tumefaciens*. Plant Cell Rep. 5:81-84.

McElroy, D.; Zhang, W.; Cov, J.; Wu, R. 1990. Isolation of an efficient actin promoter for use in rice transformation. Plant Cell 2:163-171.

McGranahan, G.H.; Leslie, C.A.; Uratsu, S.L.; Martin, L.A.; Dandekar, A.M. 1988. *Agrobacterium*-mediated transformation of walnut somatic embryos and regeneration of transgenic plants. BioTechnology 6:800-804.

Medford, J.I.; Horgan, R.; El-Sawi, Z.; Klee, H.J. 1989. Alternations of endogenous cytokinins in transgenic plants using a chimeric isopentenyl transferase gene. Plant Cell 1:403-413.

Melchers, L.S.; Thompson, D.V.; Idler, K.B.; Neuteboom, S.T.C.; De Maagd, R.A.; Schilperoort, R.A.; Hooykaas, P.J.J. 1987. Molecular characterization of the virulence gene VIR A of the *Agrobacterium tumefaciens* octopine Ti plasmid. Plant Mol. Biol. 9:635-645.

Mendel, R.R.; Muller, B.; Schulze, J.; Kolesnikov, V.; Zelenin, A. 1989. Delivery of foreign genes to intact barley cells by high-velocity microprojectiles. Theor. Appl. Genet. 78:31-34.

Meyer, P.; Heidmann, I.; Formann, G.; Saedler, H. 1987. A new petunia flower colour generated by transformation of a mutant with a maize gene. Nature 330:677-788.

Michelmore, R.; Marsh, E.; Seely, S.; Landry, B. 1987. Transformation of lettuce (*Lactuca sativa*) mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. Plant Cell Rep. 6:439-442.

Miki, B.L.; Labbé, H.; Hattori, J.; Ciellet, T.; Gabard, J.; Sunohara, G.; Charest, P.J.; Iyer, V.N. 1990. Transformation of *Brassica napus* canola cultivars with *Arabidopsis thaliana* acetohydronyacid synthase genes and analysis of herbicide resistance. Theor. Appl. Genet. 80:449-458.

Miki, B.L.A.; Reich, T.J.; Iyer, V.N. 1987. Microinjection: an experimental tool for studying and modifying plant cells. Pages 249-265 *in* Hohn, T.; Schell, J., eds, Plant DNA infectious agents. Springer-Verlag, New York.

Misra, S.; Gedamu, L. 1989. Heavy metal tolerant transgenic *Brassica napus* L. and *Nicotiana tabacum* L. plants. Theor. Appl. Genet. 78:161-168.

Mol, J., Stuitje, A.; Gerats, A.; Van der Krol, A.; Jorgensen, R. 1989. Saying it with genes: molecular flower breeding. Trends Biotechnol. 7:148-153.

Morgan, A.J., Cox, P.N.; Turner, D.A.; Peel, E.; Davey, M.R.; Gartland, K.M.A.; Mulligan, B.J. 1987. Transformation of tomato using an Ri plasmid vector. Plant Sci. 49:37-49.

Morikawa, H.; Iida, A.; Yamada, Y. 1989. Transient expression of foreign genes in plant cells and tissues obtained by a simple biolistic device (particle-gun). Appl. Microbiol. Biotechnol. 31:320-322.

Morris, J.W.; Morris, R.O. 1990. Identification of an *Agrobacterium tumefaciens* virulence gene inducer from the pinaceous gymnosperm *Pseudotsuga menziesii*. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 87:3614-3618.

Morris, J.W.; Castle, L.A.; Morris, R.O. 1989. Efficacy of different *Agrobacterium tumefaciens* strains in transformation of pinaceous gymnosperms. Physiol. Mol. Plant Pathol. 34:451-461.

Mukai, Y.; Yamamoto, N.; Odani, K.; Shinohara, K. 1991. Structure and expression of a gene for the large subunit of ribulose-1,5-bisphosphate

carboxylase/oxygenase from pine. Plant Cell Physiol. 32:273-282.

Mullins, M.G.; Tang, F.C.A.; Facciotti, D. 1990. *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of grapevines: transgenic plants of *Vitis rupestris* scheele and buds of *Vitis vinifera* L. BioTechnology 8:1041-1045.

Nagata, T.; Okada, K.; Kawazu, T.; Takabe, I. 1987. Cauliflower mosaic virus 35S promoter directs S phase specific expression in plant cells. Mol. Gen. Genet. 207:242-244.

Naina, N.S.; Gupta, P.K.; Mascarenhas, A.F. 1989. Genetic transformation and regeneration of transgenic neem (*Azadirachta indica*) plants using *Agrobacterium tumefaciens*. Curr. Sci. 58:184-187.

Negrutiu, I.; Shillito, R.; Potrykus, I.; Biasini, G.; Sala, F. 1987. Hybrid genes in the analysis of transformation conditions. I. Setting up a simple method for direct gene transfer in plant protoplasts. Plant Mol. Biol. 8:363-373.

Nehra, N.S.; Shibbar, R.N.; Kartha, K.K.; Datla, R.S.S.; Crosby, W.L.; Strushnoff, C. 1990. *Agrobacterium* mediated transformation of strawberry calli and recovery of transgenic plants. Plant Cell Rep. 9:10-13.

Nelson, R.S.; McCormick, S.M.; Delannay, Z.; Dubé, P.; Layton, J.; Anderson, E.J.; Kaniewska, M.; Proksch, R.K.; Horsch, R.B.; Rogers, S.G.; Fraley, R.T.; Beachy, R.N. 1988. Virus tolerance, plant growth, and field performance of transgenic tomato plants expressing coat protein from tobacco mosaic virus. BioTechnology 6:403-409.

Nester, E.W.; Kosuge, T. 1981. Plasmids specifying plant hyperplasias. Annu. Rev. Microbiol. 35:531-565.

Nester, E.W.; Gordon, M.P.; Amasino, R.M.; Yanofsky, M.F. 1984. Crown gall: a molecular and physiological analysis. Annu. Rev. Plant Physiol. 35:387-413.

Neuhaus, G.; Spangenberg, G.; Mittelstenscheid, O.; Schweiger, H.G. 1987. Transgenic rapeseed plants obtained by the microinjection of DNA into microspore-derived embryoids. Theor. Appl. Genet. 75:30-36.

Neuhaus, J.M.; Ahl-Goy, P.; Hinz, V.; Flores, S.; Meins, F., Jr. 1991. High-level expression of a tobacco chitinase gene in *Nicotiana sylvestris*. Susceptibility of transgenic plants to *Cercospora nicotianae* infection. Plant Mol. Biol. 16:141-151.

Noda, T.; Tanaka, N.; Mano, Y.; Nabeshima, S.; Ohkawa, H.; Matsui, C. 1987. Regeneration of horseradish hairy root incited by *Agrobacterium rhizogenes* infection. Plant Cell Rep. 6:283-286.

Oard, J.H.; Paige, D.F.; Simmonds, J.A.; Gradziel, T.M. 1990. Transient gene expression in maize, rice, and wheat cells using an airgun apparatus. Plant Physiol. 92:334-339.

Odell, J.T.; Nagy, F.; Chua, N.H. 1985. Identification of DNA sequences required for activity of the cauliflower mosaic virus 35S promoter. Nature 313:810-812.

Ooms, G.; Hooykaas, P.J.J.; Van Veen, R.J.M.; Van Beelen, P.; Regensburg-Trink, T.J.B.; Schilperoort, R.A. 1982. Octopine Ti plasmid deletion mutants of *Agrobacterium tumefaciens* with emphasis on the right side of the T-region. Plasmid 7:15-29.

Ooms, G.; Burrell, M.M.; Karp, A.; Bevan, M.; Hille, J. 1987. Genetic transformation in two potato cultivars with T-DNA from disarmed *Agrobacterium*. Theor. Appl. Genet. 73:744-750.

Ou-Lee, T.M.; Turgeon, R.; Wu, R. 1986. Expression of a foreign gene linked to either a plant-virus or a *Drosophila* promoter, after electroporation of protoplasts of rice, wheat, and sorghum. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 83:6815-6819.

Ow, D.W.; Wood, K.V.; De Luca, M.; De Wet, J.R.; Helinski, D.R.; Howell, S.H. 1986. Transient and stable expression of the firefly luciferase gene in plant cells and transgenic plants. Science 234:856-859.

Pang, S.Z.; Sanford, J.C. 1988. *Agrobacterium*-mediated gene transfer in papaya. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 113:287-291.

Parke, D.; Ornston, L.N.; Nester, E.W. 1987. Chemotaxis to plant phenolic inducers of virulence genes is constitutively expressed in the absence of the Ti plasmid in *Agrobacterium tumefaciens*. J. Bacteriol. 169:5336-5338.

Parsons, T.J.; Sinkar, V.P.; Stettler, R.F.; Nester, E.W.; Gordon, M.P. 1986. Transformation of poplar by *Agrobacterium tumefaciens*. BioTechnology 4:533-537.

Paszkowski, J.; Shillito, R.D.; Saul, M.; Mandak, V.; Hohn, T.; Hohn, B.; Potrykus, I. 1984. Direct gene transfer to plants. EMBO J. 3:2717-2722.

Paszkowski, J.; Pisan, B.; Shillito, R.D.; Hohn, T.; Hohn, B.; Potrykus, I. 1986. Genetic transformation of *Brassica campestris* var. *rapa* protoplasts with an engineered cauliflower mosaic virus genome. Plant Mol. Biol. 6:303-312.

Peacock, J. 1990. Ways to pollen sterility. Nature 347:714-715.

Peralta, E.G.; Ream, L.W. 1985. T-DNA border sequences required for crown gall tumorigenesis. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 82:5112-5116.

Peralta, E.G.; Hellmiss, R.; Ream, W. 1986. Overdrive, a T-DNA transmission enhancer on the *A. tumefaciens* tumour-inducing plasmid. EMBO J. 5:1137-1142.

Perez, P.; Tiraby, G.; Kallerhoff, J.; Perret, J. 1989. Phleomycin resistance as a dominant selectable marker for plant cell transformation. Plant Mol. Biol. 13:365-373.

Petit, A.; David, C.; Dahl, G.A.; Ellis, J.M.; Guyon, P.; Casse-Delbart, F.; Tempé, J. 1983. Further extension of the opine concept: plasmids in *Agrobacterium rhizogenes* cooperate for opine degradation. Mol. Gen. Genet. 190:204-214.

Phelep, M.; Petit, A.; Martin, L.; Duhoux, E.; Tempé, J. 1991. Transformation and regeneration of a nitrogen-fixing tree, *Allocasuarina verticillata* Lam. BioTechnology 9:461-466.

Phytoud, F.; Sinkar, V.P.; Nester, E.W.; Gordon, M.P. 1987. Increased virulence of *Agrobacterium rhizogenes* conferred by the VIR region of pTi BO542: application to genetic engineering of poplar. BioTechnology 5:1323-1327.

Poon, C.P.C. 1984. Removal of cadmium from wastewaters. Experientia 40:127-136.

Porter, S.G.; Yanofsky, M.F.; Nester, E.W. 1987. Molecular characterization of the VIR D operon from *Agrobacterium tumefaciens*. Nucleic Acids Res. 15:7503-7517.

Potrykus, I. 1990. Gene transfer to cereals: an assessment. Biotechnology 8:535-542.

Potrykus, I.; Paszkowski, J.; Shillito, R.D.; Saul, M.W. 1987. Direct gene transfer to plants. Pages 230-248 *in* T. Hohn and J. Schell, eds. Plant DNA infectious agents. Springer-Verlag, New York.

Powell, P.A.; Stark, D.M.; Sanders, P.R.; Beachy, R.N. 1989. Protection against tobacco mosaic virus in transgenic plants that express tobacco mosaic virus antisense RNA. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 86:6949-6952.

Powell-Abel, P.; Nelson, R.S.; De, B.; Hoffmann, N.; Rogers, S.G.; Fraley, R.T.; Beachy, R.N. 1986. Delay of disease development in transgenic plants that express the tobacco mosaic virus coat protein gene. Science 323:738-743.

Pua, E.C.; Mehra-Palta, A.; Nagy, F.; Chua, N.H. 1987. Transgenic plants of *Brassica napus* L. BioTechnology 5:815-817.

Puertas, M.J.; De La Pena, A.; Estades, B.; Merino, F. 1984. Early sensitivity to colchicine in developing anthers of rye. Chromosoma 89:121-126.

Puonti-Kaerlas, J.; Eriksson, T.; Engström, P. 1990. Production of transgenic pea (*Pisum staivum* L.) plants by *Agrobacterium tumefaciens*-mediated gene transfer. Theor. Appl. Genet. 80:246-252.

Raffa, K.F. 1989. Genetic engineering of trees to enhance resistance to insects: evaluating the risks of biotype evolution and secondary pest outbreak. BioScience 39:524-534.

Ray, T.B. 1986. Sulfonylurea herbicides as inhibitors of amino acid biosynthesis in plants. Trends Biochem. Sci. 11:180-183.

Rech, E.L.; Golds, T.J.; Hammatt, N.; Mulligan, B.J.; Davey, M.R. 1988. *Agrobacterium rhizogenes* mediated transformation of the wild soybeans *Glycine canescens* and *G. candestina*: production of transgenic plants of *G. canescens*. J. Exp. Bot. 39:1275-1285.

Reich, T.J.; Iyer, V.N.; Haffner, M.; Holbrook, L.A.; Miki, B.L. 1986a. The use of fluorescent dyes in the microinjection of alfalfa protoplasts. Can. J. Bot. 64:1259-1267.

Reich, T.J.; Iyer, V.N.; Miki, B.L. 1986b. Efficient transformation of alfalfa protoplasts by the intranuclear microinjection of Ti plasmids. BioTechnology 4:1001-1004.

Reich, T.J.; Iyer, V.N.; Scobie, B.; Miki, B.L. 1986c. A detailed procedure for the intranuclear microinjection of plant protoplasts. Can. J. Bot. 64:1255-1258.

Rhodes, C.A.; Pierce, D.A.; Mettler, I.J.; Mascarenhas, D.; Detmer, J.J. 1988. Genetically transformed maize plants from protoplasts. Science 240:204-207.

Riker, A.J.; Banfield, W.M.; Wright, W.H.; Keitt, G.W.; Sagen, H.E. 1930. Studies on infectious hairy-root of nursery apple tree. J. Agric. Res. 41:507-540.

Risuelo, G.; Battistoni, P.; Costantino, P. 1982. Regions of homology between tumorigenic plasmids from *Agrobacterium rhizogenes* and *Agrobacterium tumefaciens*. Plasmid 7:45-51.

Roberds, J.H.; Namkoong, G.; Skrøppa, T. 1990. Genetic analysis of risk in clonal populations of forest trees. Theor. Appl. Genet. 79:841-848.

Robertson, J.L.; Holliday, T.; Matthysse, A.G. 1988. Mapping of *Agrobacterium tumefaciens* chromosomal genes affecting cellulose synthesis and bacterial attachment to host cells. J. Bacteriol. 170:1408-1411.

Rogers, S.G.; Klee, H. 1987. Pathways to plant genetic manipulation employing *Agrobacterium*. Pages 179-204 *in* Hohn, T.; Schell, J., eds. Plant DNA infectious agent. Springer-Verlag, New York.

Rogowsky, P.M.; Close, T.J.; Chimera, J.A.; Shaw, J.J.; Kado, C.I. 1987. Regulation of the VIR genes of *Agrobacterium tumefaciens*. J. Bacteriol. 169:5101-5102.

Rosenberg, N.; Gad, A.E.; Altman, A.; Navot, N.; Czosnek, H. 1988. Liposome-mediated introduction of the chloramphenicol acetyl transferase (CAT) gene and its expression in tobacco protoplasts. Plant Mol. Biol. 10:185-191.

Ryan, C.A.; An, G. 1988. Molecular biology of wound inducible proteinase inhibitors in plants. Plant Cell and Env. 11:345-349.

Sanders, P.R.; Winter, J.A.; Barnason, A.R.; Rogers, S.G.; Fraley, R.T. 1987. Comparison of cauliflower mosaic virus 35S and nopaline synthase promoters in transgenic plants. Nucleic Acids Res. 15:1543-1558.

Sanford, J.C.; Klein, T.M.; Wolf, E.D.; Allen, N. 1987. Delivery of substances into cells and tissues using a particle bombardment process. Particulate Sci. Technol. 5:27-37.

Scorza, R.; Morgens, P.H.; Cordts, J.M.; Mante, S.; Callahan, A.M. 1990. *Agrobacterium*-mediated transformation of peach (*Prunus persica* L. Batsch) leaf segments, immature embryos, and long-term embryogenic callus. In Vitro Cell Dev. Biol. 26:829-834.

Sederoff, R.R.; Stomp, A.M.; Chilton, W.S.; Moore, L.W. 1986. Gene transfer into loblolly pine by *Agrobacterium tumefaciens*. BioTechnology 4:647-649.

Séguin, A.; Lalonde, M. 1988. Gene transfer by electroporation in Betulaceae protoplasts: *Alnus incana*. Plant Cell Rep. 7:367-370.

Sen, P.; Pazour, G.J.; Anderson, D.; Das, A. 1989. Cooperative binding of *Agrobacterium tumefaciens* VIR E2 protein to single stranded DNA. J. Bacteriol. 171:2573-2580.

Shah, D.M.; Horsch, R.B.; Klee, H.J.; Kishore, G.M.; Winter, J.A.; Turner, N.E.; Hironaka, C.M.; Sanders, P.R.; Gasser, C.S.; Aykent, S.; Siegel, N.R.; Rogers, S.G.; Fraley, R.T. 1986. Engineering herbicide tolerance in transgenic plants. Science 233:478-481.

Shahin, E.A.; Simpson, R.B. 1986. Gene transfer system for potato. HortSci. 21:1199-1201.

Shahin, E.A.; Spielmann, A.; Sukhapinda, K.; Simpson, R.B.; Yashar, M. 1986a. Transformation of cultivated alfalfa using disarmed *Agrobacterium tumefaciens*. Crop Sci. 26:1235-1239.

Shahin, E.A.; Sukhapinda, K.; Simpson, R.B.; Spivey, R. 1986b. Transformation of cultivated tomato by a binary vector in *Agrobacterium rhizogenes*: transgenic plants with normal phenotypes harbor binary vector T-DNA, but no Ri plasmid T-DNA. Theor. Appl. Genet. 72:770-777.

Shaw, C.H.; Ashby, A.M.; Brown, A.; Royal, C.; Loake, G.J.; Shaw, C.H. 1988. VIR A and VIR G are the Ti plasmid functions required for chemotaxis of *Agrobacterium tumefaciens* towards acetosyringone. Mol. Microbiol. 2:413-417.

Shaw, C.H.; Carter, G.H.; Watson, M.D.; Shaw, C.H. 1984. A functional map of the nopaline synthase promoter. Nucleic Acids Res. 12:7831-7846.

Shillito, R.D.; Saul, M.W.; Paszowski, J.; Muller, M.; Potrykus, I. 1985. High efficiency direct gene transfer to plants. BioTechnology 3:1099-1103.

Shimamoto, K.; Terada, R.; Izarva, T.; Fujimoto, H. 1989. Fertile transgenic rice plants regenerated from transformed protoplasts. Nature 338:274-276.

Slightom, J.L.; Jouanin, L.; Leach, F.; Drong, R.F.; Tepfer, D. 1985. Isolation and identification of TL-DNA/plant junctions in *Convolvulus arvensis* transformed by *Agrobacterium rhizogenes* strain A4. EMBO J. 4:3069-3077.

Smith, C.J.S.; Watson, C.F.; Ray, J.; Bird, C.R.; Morris, P.C.; Schuch, W.; Grierson, D. 1988. Antisense RNA inhibition of polygalacturonase gene expression in transgenic tomatoes. Nature 334:724-726.

Smith, C.J.S.; Watson, C.F.; Morris, P.C.; Bird, C.R.; Seymour, G.B.; Gray, J.E.; Arnold, C.; Tucker, G.A.; Schuch, W.; Harding, S.; Grierson, D. 1990. Inheritance and effect on ripening of antisense polygalacturonase genes in transgenic tomatoes. Plant Mol. Biol. 14:369-379.

Smith, C.O. 1935a. Crown gall on conifers. Phytopath. 25:894.

Smith, C.O. 1935b. Crown gall on the sequoia. Phytopath. 25:439-440.

Smith, C.O. 1936. Crown gall on *Araucaria biduillii*. Phytopath. 26:400-401.

Smith, C.O. 1937. Crown gall on incense cedar, *Libocedrus decurrens*. Phytopath. 27:844-849.

Smith, C.O. 1938. Crown gall on *Taxus baccata*. Phytopath. 28:153-155.

Smith, C.O. 1939. Susceptibility of species of *Cupressaceae* to crown gall as determined by artificial inoculation. J. Agric. Res. 59:919-925.

Smith, C.O. 1942. Crown gall on species of *Taxaceae*, *Taxodiaceae*, and *Pinaceae*, as determined by artificial inoculations. Phytopath. 32:1005-1009.

Smith, E.F.; Townsend, C.O. 1907. A plant tumor of bacterial origin. Science 25:671-673.

Spena, A.; Schmulling, T.; Koncz, C.; Schell, J.S. 1987. Independent and synergistic activity of ROL A, B and C loci in stimulating abnormal growth in plants. EMBO J. 6:3891-3899.

Srinivasan; Yanofsky, M.F.; Nester, E.W. 1989. Structural genes VIR C1 and VIR C2 of the host range determining VIR C operon are determinants of virulence in *Agrobacterium tumefaciens*. J. Genet. 68:23-28.

Stachel, S.E.; Nester, E.W. 1986. The genetic and transcriptional organization of the VIR region of the A6 Ti plasmid of Agrobacterium tumefaciens. EMBO J. 5:1445-1454.

Stachel, S.E.; An, G.; Flores, C.; Nester, E.W. 1985a. A TN3 lac Z transposon for the random generation of β-galactosidase gene fusions: application to the analysis of gene expression in *Agrobacterium*. EMBO J. 4:891-898.

Stachel, S.E.; Nester, E.W.; Zambryski, P.C. 1986a. A plant cell factor induces *Agrobacterium tumefaciens* VIR gene expression. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 83:379-383.

Stachel, S.E.; Timmerman, B.; Zambryski, P. 1986b. Generation of single-stranded T-DNA molecules during the initial stages of T-DNA transfer from *Agrobacterium tumefaciens* to plant cells. Nature 322:706-712.

Stachel, S.E.; Timmerman, B.; Zambryski, P. 1987. Activation of *Agrobacterium tumefaciens* VIR gene expression generates multiple single-stranded T-strand molecules from the pTiA6 T-region: requirement for 5' VIR D gene products. EMBO J. 6:857-863.

Stalker, O.M.; McBride, K.E.; Malyj, L.D. 1988. Herbicide resistance in transgenic plants expressing a bacterial detoxification gene. Science 242:419-423.

Stark, D.M.; Beachy, R.N. 1989. Protection against potyvirus infection in transgenic plants: evidence for broad spectrum resistance. BioTechnology 7:1257-1262.

Steinrucken, H.E.; Amrhein, N. 1980. The herbicide glyphosate is a potent inhibitor of 5-enolpyruvylshikimic acid-3-phosphate synthase. Biochem. Biophys. Res. Commun. 94:1207-1212.

Stomp, A.M.; Loopstra, C.; Chilton, W.S.; Sederoff, R.S.; Moore, L.W. 1990. Extended host range of *Agrobacterium tumefaciens* in the genus *Pinus*. Plant Physiol. 92:1226-1232.

Stomp, A.M.; Weissinger, A.; Sederoff, R.R. 1991. Transient expression from microprojectile-mediated DNA transfer in *Pinus taeda*. Plant Cell Reports (in press).

Stougaard-Jensen, J.; Marcker, K.A.; Otten, L.; Schell, J. 1986. Nodule-specific expression of a chimeric soybean leghaemoglobin gene in transgenic *Lotus corniculatus*. Nature 321:669-674.

Streber, W.R.; Willmitzer, L. 1989. Transgenic tobacco plants expressing a bacterial detoxifying enzyme are resistant to 2,4-D. BioTechnology 7:811-816.

Tachibana, K.; Watanabe, T.; Sekizawa, Y.; Takamatsu, T. 1986. Accumulation of ammonia in plants treated with bialaphos. J. Pest. Sci. 11:33-37.

Tanaka, N.; Ikegami, M.; Hohn, T.; Matsui, C.; Watanabe, I. 1984. *E. coli* spheroplast-mediated transfer of cloned cauliflower mosaic virus DNA into plant protoplasts. Mol. Gen. Genet. 195:378-380.

Tautorus, T.E.; Bekkaoui, F.; Pilon, M.; Datla, R.S.S.; Crosby, W.L.; Fourke, L.C.; Dunstan, D.I. 1989. Factors affecting transient gene expression in electroporated black spruce (*Picea mariana*) and jack pine (*Pinus banksiana*) protoplasts. Theor. Appl. Genet. 78:531-536.

Tavazza, R.; Ordas, R.J.; Tavazza, M.; Ancora, G.; Benvemito, E. 1988. Genetic transformation of *Nicotiana clevelandii* using a Ti plasmid derived vector. J. Plant Physiol. 133:640-644.

Thomashow, M.F.; Panagopoulos, C.; Gordon, M.P.; Nester, E.W. 1980. Host range of *Agrobacterium tumefaciens* is determined by the Ti-plasmid. Nature 283:794-796.

Thomashow, M.F.; Karliensey, J.E.; Marks, J.R.; Hurlbert, R.E. 1987. Identification of a new virulence locus in *Agrobacterium tumefaciens* that affects polysaccharide composition and plant cell attachment. J. Bacteriol. 169:3209-3216.

Thompson, C.J.; Movva, N.R.; Tizard, R.; Crameri, R.; Davis, J.E.; Lauwereys, M.; Botterman, J. 1987a. Characterization of the herbicide-resistance gene *bar* from *Streptomyces hygroscopicus*. EMBO J. 6:2519-2523.

Thompson, D.V.; Melchers, L.S.; Idler, K.B.; Schilperoort, R.A.; Hooykaas, P.J.J. 1988. Analysis of the complete nucleotide sequence of the *Agrobacterium tumefaciens* VIR B operon. Nucleic Acids Res. 16:4621-4636.

Thompson, G.A.; Hiatt, W.R.; Facciotti, D.; Stalker, D.M.; Comai, L. 1987b. Expression in plants of a bacterial gene coding for glyphosate resistance. Weed Sci. 35:19-23.

Thornburg, R.W.; An, G.; Cleveland, T.E.; Johnson, R.; Ryan, C.A. 1987. Wound-inducible expression of a potato inhibitor II-chloramphenicol acetyltransferase gene fusion in transgenic tobacco plants. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 84:744-748.

Timko, M.P.; Kausch, A.P.; Castresana, C.; Fassler, J.; Herrera-Estrella, L.; Van Den Broeck, G.; Van Montagu, M.; Schell, J.; Cashmore, A.R. 1985. Light regulation of plant gene expression by an upstream enhancer-like element. Nature 318:579-582.

Tomes, D.T.; Weissinger, A.K.; Ross, M.; Higgins, R.; Drummond, B.J.; Schaaf, S.; Malone-Schoneberg, J.B.; Staebell, M.; Flynn, P.; Anderson, J.; Howard, J. 1990. Transgenic tobacco plants and their progeny derived by microprojectile bombardment of tobacco leaves. Plant Mol. Biol. 14:261-268.

Topfer, R.; Gronenborn, B.; Schell, J.; Steinbiss, H.H. 1989. Uptake and transient expression of chimeric genes in seed-derived embryos. Plant Cell 1:133-139.

Toriyama, K.; Arimoto, Y.; Uchimiya, H.; Hinata, K. 1988. Transgenic rice plants after direct gene transfer into protoplasts. BioTechnology 6:1072-1074.

Trinh, T.H.; Mante, S.; Pua, E.C.; Chua, N.H. 1987. Rapid production of transgenic flowering shoots and F1 progeny from *Nicotiana plumbaginifolia* epidermal peels. BioTechnology 5:1081-1084.

Trulson, A.J.; Simpson, R.B.; Shanin, E.A. 1986. Transformation of cucumber (*Cucumis sativus* L.) plants with *Agrobacterium rhizogenes*. Theor. Appl. Genet. 73:11-15.

Tsai, C.H.; Strauss, S.H. 1989. Dispersed repetitive sequences in the chloroplast genome of Douglas-fir. Curr. Genet. 16:211-218.

Tumer, N.E.; O'Connell, K.M.; Nelson, R.S.; Sanders, P.R.; Beachy, R.N.; Fraley, R.T.; Shah, D.M. 1987. Expression of alfalfa mosaic virus coat protein gene confers cross-protection in transgenic tobacco and tomato plants. EMBO J. 6:1181-1188.

Twell, D.; Klein, T.M.; Fromm, M.E.; McCormick, S. 1989. Transient expression of chimeric genes delivered into pollen by microprojectile bombardment. Plant Physiol. 91:1270-1274.

Tyagi, S.; Sporlein, B.; Tyagi, A.K.; Herrmann, R.G.; Koop, H.V. 1989. PEG- and electroporation-induced transformation in *Nicotiana tabacum*: influence of genotype on transformation frequencies. Theor. Appl. Genet. 78:287-292.

Uchimiya, H.; Fushimi, T.; Hasimoto, H.; Harada, H.; Syono, K.; Sugawara, Y. 1986. Expression of a foreign gene in callus derived from DNA-treated protoplasts of rice (*Oryza sativa* L.). Mol. Gen. Genet. 204:204-207.

Umbeck, P.; Johnson, G.; Barton, K.; Swain, Q. 1987. Genetically transformed cotton (*Gossypium hirsutum* L.) plants. BioTechnology 5:263-266.

Vaeck, M.; Reynaerts, A.; Hofte, H.; Jansens, S.; De Beuckeleer, M.; Dean, C.; Zabeau, M.; Van Montagu, M.; Leemans, J. 1987. Transgenic plants protected from insect attack. Nature 328:33-37.

Vahala, T.; Stabel, P.; Eriksson, T. 1989. Genetic transformation of willows (*Salix* spp.) by *Agrobacterium tumefaciens*. Plant Cell Rep. 8:55-58.

Van derKrol, A.R.; Mur, L.A.; de Lange, P.; Mol, J.N.M.; Stuitje, A.R. 1990. Inhibition of flower pigmentation by antisense CHS genes: promoter and minimal sequence requirements for the antisense affect. Plant Mol. Biol. 14:457-466.

Van Dun, C.M.P.; Bol, J.F. 1988. Transgenic tobacco plants accumulating tobacco rattle virus coat protein resist infection with tobacco rattle virus and pea early browning virus. Virology 167:649-652.

Van Dun, C.M.P.; Overduin, B.; van Vloten-Doting, L.; Bol, J.F. 1988. Transgenic tobacco expressing tobacco streak virus or mutated alfalfa mosaic virus coat protein does not cross-protect against alfalfa mosaic virus infection. Virology 164:383-389.

Van Haute, E.; Joos, H.; Maes, M.; Warren, G.; Van Montagu, M.; Schell, J. 1983. Intergeneric transfer and exchange recombination of restriction fragments cloned in pBR322: a novel strategy for the reversed genetics of the Ti plasmids of *Agrobacterium tumefaciens*. EMBO J. 2:411-417.

Van Larebeke, N.; Genetello, C.; Schell, J.; Schilperoort, R.A.; Hermans, A.K.; Hernalsteens, J.P.; Van Montagu, M. 1975. Acquisition of tumour-inducing ability by non-oncogenic agrobacteria as a result of plasmid transfer. Nature 233:742-743.

Vardi, A.; Bleichman, S.; Aviv, D. 1990. Genetic transformation of Citrus protoplasts and regeneration of transgenic plants. Plant Sci. 69:199-206.

Veluthambi, K.; Jayaswal, R.K.; Gelvin, S.B. 1987. Virulence genes A, G, D mediate the double-stranded border cleavage of T-DNA from the *Agrobacterium* Ti plasmid. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 84:1881-1885.

Veluthambi, K.; Ream, W.; Gelvin, S.B. 1988. Virulence genes, borders and overdrive generate single-stranded T-DNA molecules from the A6 Ti plasmid of *Agrobacterium tumefaciens*. J. Bacteriol. 170:1523-1532.

Venderkerckhove, J.; Van Damme, J.; Van Lysebettens, M; Botterman, J.; De Block, M.; Vandenicle, M.; De Clercq, A.; Leemans, J.; Van Montagu, M.; Krebbers, E. 1989. Enkephalins produced in transgenic plants using modified 2S seed storage proteins. BioTechnology 7:929-932.

Veluthambi, K.; Krishnan, M.; Gould, J.H.; Smith, R.H.; Gelvin, S.B. 1989. Opines stimulate induction of the VIR genes of the *Agrobacterium tumefaciens* Ti plasmid. J. Bacteriol. 171:3696-3703.

Waldron, C.; Murphy, E.B.; Roberts, J.L.; Gustafson, G.D.; Armour, S.L.; Malcom, S.K. 1985. Resistance to hygromycin G: new marker for plant transformation studies. Plant Mol. Biol. 5:103-108.

Wallroth, M.; Gerats, A.D.M.; Rogers, S.G.; Fraley, R.T.; Horsch, R.B. 1986. Chromosomal location of foreign genes in *Petunia hybrida*. Mol. Gen. Genet. 202:6-15.

Wang, K.; Genetello, C.; Van Montagu, M.; Zambryski, P.C. 1987a. Sequence context of the T-DNA border repeat element determines its relative activity during T-DNA transfer to plant cells. Mol. Gen. Genet. 210:338-346.

Wang, K.; Stachel, S.E.; Timmerman, B.; Van Montagu, M.; Zambryski, P.C. 1987b. Site-specific nick in the T-DNA border sequence as a result of *Agrobacterium* VIR gene expression. Science 235:587-591.

Wang, Y.C.; Klein, T.M.; Fromm, M.; Cao, J.; Sanford, J.C.; Wu, R. 1988. Transient expression of foreign genes in rice, wheat and soybean cells following particle bombardment. Plant Mol. biol. 11:433-439.

Ward, J.E.; Akiyoshi, D.E.; Regier, D.; Datta, A.; Gordon, M.P.; Nester, E.W. 1988. Characterization of the VIR B operon from an *Agrobacterium tumefaciens* Ti plasmid. J. Biol. Chem. 263:5804-5814.

Watson, B.; Currier, T.C.; Gordon, M.P.; Chilton, M.D.; Nester, E.W. 1975. Plasmid required for virulence of *Agrobacterium tumefaciens*. J. Bacteriol. 123:255-264.

Webb, K.J.; Jones, S.; Robbins, M.P.; Minchin, F.R. 1990. Characterization of transgenic root cultures of *Trifolium repens*, *Trifolium protense* and *Lotus corniculatus* and transgenic plants of *Lotus corniculatus*. Plant Sci. 70:243-254.

Weber, G.; Monajembashi, S.; Greulich, K.O.; Wolfrum, J. 1988. Genetic manipulation of plant cells and organelles with a laser microbeam. Plant Cell Tissue Organ Cult. 12:219-222.

Weber, G.; Monajembashi, S.; Wolfrum, J.; Greulich, K.O. 1989a. A laser microbeam as a tool to introduce genes into cells and organelles of higher plants. Ber. Bunsen-ges. Phys. Chem. 93:292-254.

Weber, G.; Monajembashi, S.; Greulich, K.O.; Wolfrum, J. 1989b. Uptake of DNA in chloroplasts of *Brassica napus* (L.) facilitated by a uv-laser microbeam. Eur. J. Cell Biol. 49:73-79.

Weer, W.; Lörz, H. 1986. Transient gene expression in a *Gramineae* cell line: a rapid procedure for studying plant promoters. Mol. Gen. Genet. 202:471-475.

Wei, Z.M.; Kamada, H.; Harada, H. 1986. Transformation of *Solanum nigrum* L. protoplasts by *Agrobacterium rhizogenes*. Plant Cell Rep. 5:93-96.

Weiler, E.W.; Schroder, J. 1987. Hormone genes and crown gall disease. Trends Biochem. Sci. 12:271-275.

White, D.W.R.; Greenwood, D. 1987. Transformation of the forage legume *Trifolium repens* L. using binary *Agrobacterium* vectors. Plant. Mol. Biol. 8:461-469.

White, F.F.; Nester, E.W. 1980a. Hairy root: plasmid encodes virulence traits in *A. rhizogenes*. J. Bacteriol. 141:1134-1141.

White, F.F.; Nester, E.W. 1980b. Relationship of plasmids responsible for hairy root and crown gall tumorigenicity. J. Bacteriol. 144:710-720.

Wilson, S.M.; Thorpe, T.A.; Moloney, M.M. 1989. PEG-mediated expression of GUS and CAT genes in protoplasts from embryogenic suspension cultures of *Picea glauca*. Plant Cell Rep. 7:704-707.

Winans, S.C. 1990. Transcriptional induction of an *Agrobacterium* regulatory gene at tandem promoters by plant-released phenolic compounds, phosphate starvation, and acidic growth media. J. Bacteriol. 172:2433-2438.

Wirtz, V.; Schell, J.; Czernilofsky, A.P. 1987. Recombination of selectable marker DNA in *Nicotiana tabacum*. DNA 6:245-253.

Witty, M. 1989. Thaumatin II: simple marker gene for use in plants. Nucleic Acids Res. 17:3312.

Wullems, G.J.; Molendijk, L.; Ooms, G.; Schilperoort, R.A. 1981. Retention of tumor markers in F1 progeny plants from *in vitro* induced octopine and nopaline tumor tissues. Cell 24:719-727.

Yamamoto, A.; Iwahashi, M.; Yanofsky, M.F.; Nester, E.W.; Takebe, I.; Machida, Y. 1987. The promoter proximal region in the VIR D locus of *Agrobacterium tumefaciens* is necessary for the plant inducible circularization of T-DNA. Mol. Gen. Genet. 206:174-177.

Yamamoto, N.; Kano-Murakami, N.Y.; Matsuotia, M.; Ohashi, Y.; Tanaka, Y. 1988a. Mucleotide sequence of a full length cDNA clone of ribulose bisphosphate carboxylase small subunit gene from green dark-grown pine (*Pinus thunbergii*) seedling. Nucleic Acids Res. 16:11830.

Yamamoto, N.; Matsuoka, M.; Kano-Murakiami, Y.; Tanaka, Y.; Ohashi, Y. 1988b. Nucleotide sequence of a full length cDNA clone of light harvesting chlorophyll a/b binding protein gene from green dark-grown pine (*Pinus thunbergii*) seedling. Nucleic Acids Res. 16:11829.

Yang, M.S.; Espinoza, N.O.; Nogpala, P.G.; Dodds, J.H.; White, F.F.; Schnorr, K.L.; Jaymes, J.M. 1989. Expression of a synthetic gene for improved protein quality in transformed potato plants. Plant Sci. 64:99-111.

Yanofsky, M.; Lowe, B.; Montoya, A.; Rubin, R.; Krul, W.; Gordon, M.; Nester, E. 1985a. Molecular and genetic analysis of factors controlling host range in *Agrobacterium tumefaciens*. Mol. Gen. Genet. 201:237-246.

Yanofsky, M.; Montoya, A.; Knauf, B.; Lowe, B.; Gordon, M.; Nester, E. 1985b. Limited host-range plasmid of *Agrobacterium tumefaciens*: molecular and genetic analyses of transferred DNA. J. Bacteriol. 163:341-348.

Yanofsky, M.F.; Nester, E.W. 1986. Molecular characterization of a host-range-determining locus from *Agrobacterium tumefaciens*. J. Bacteriol. 168:244-250.

Yanofsky, M.F.; Porter, S.G.; Young, C.; Albright, L.M.; Gordon, M.P.; Nester, E.W. 1986. The VIR D operon of *Agrobacterium tumefaciens* encodes a site-specific endonuclease. Cell 47:471-477.

Zaenen, I.; Van Larebeke, N.; Teuchy, H.; Van Montagu, M.; Schell, J. 1974. Supercoiled circular DNA in crown gall inducing *Agrobacterium* strains. J. Mol. Biol. 86:109-127.

Zambryski, P.; Joos, H.; Genetello, C.; Leemans, J.; Van Montagu, M.; Schell, J. 1983. Ti plasmid vector for the introduction of DNA into plant cells without alteration of their normal regeneration capacity. EMBO J. 2:2143-2150.

Zhang, H.M.; Yang, H.; Rech, E.L.; Golds, T.J.; Dans, S.A.; Mulligan, B.J.; Cocking, E.C.; Davey, M.R. 1988. Transgenic rice plants produced by electroporation-mediated plasmid uptake into protoplasts. Plant Cell Rep. 7:379-384.

Zorreguieta, A.; Geremia, R.A.; Cavaignac, S.; Cangelosi, G.A.; Nester, E.N.; Ugalde, R.A. 1988. Identification of the product of an *Agrobacterium tumefaciens* chromosomal virulence gene. Mol. Plant Microbe Interact. 1:121-127.